
Stressresponser utløst av sveiserøykpartikler i epiteliale lungeceller

Heidi Trillerud



Hovedfagsoppgave for graden Cand. pharm. ved

Avdeling for farmakologi

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Universitetet i Oslo

Utført ved

Nasjonalt folkehelseinstitutt, Oslo

April 2006

FORORD.....	4
SAMMENDRAG.....	5
FORKORTELSER.....	6
1 INNLEDNING.....	7
1.1 Partikkelegenskaper	8
1.2 Respirasjonssystemet.....	10
1.2.1 Anatomi	10
1.2.2 Celletyper i lungene	11
1.2.3 Deponering og ”clearance” av partikler i luftveiene	12
1.3 Helseskadelige effekter av sveiserøyk	14
1.4 Lungeinflammasjon	15
1.4.1 Cytokiner i inflammasjonsresponsen	16
Interleukin-8.....	17
1.5 Celledød	19
1.6 Signalveier i inflammasjonsresponsen.....	20
1.6.1 Mitogen aktiverte protein (MAP)-kinaser.....	20
ERK modulen (Ekstracellulært signalregulerte-kinaser).....	21
P38 modulen.....	22
JNK-modulen.....	23
1.6.2 Membran-reseptorer	23
1.7 Sveiserøyk og inflammasjon	25
1.8 Mål for oppgaven	27
2 MATERIALER OG METODER	28
2.1 Materialer	28
2.2 Metoder	33
2.2.1 Celler og dyrkningsbetingelser.....	33
2.2.2 Partikler	33
2.2.3 Eksponeringsbetingelser.....	34
2.2.4 Bestemmelse av viabilitet ved fluorescensmikroskopi	37
2.2.5 Måling av cytokiner ved Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	38

2.2.6	Elektroforese og Western immunoblotting	40
2.2.7	Immunopresipitering av epidermal vekstfaktor-reseptor (EGFR)	43
2.2.8	Statistikk	45
3	RESULTATER.....	46
3.1	Etablering av dyrknings- og eksponeringsbetingelser	46
3.1.1	Effekt av serum og albumin i kulturene ved eksponering for sveiserøykpartikler	46
3.1.2	Uttesting av ulike BSA-konsentrasjoner	48
3.1.3	Frigjøring av IL-8 ved etablerte kulturbetingelser	50
3.2	Regulering av IL-8-frigjøring.....	52
3.3	Partikkelegenskaper og evnen til å indusere IL-8-respons	53
3.3.1	Løselig/vasket fraksjon av partikler	53
3.3.2	Metaller i løselig fraksjon	54
3.4	Signalveier involvert i IL-8-respons etter eksponering for sveiserøykpartikler	55
3.4.1	Betydning av ERK-aktivering.....	55
3.4.2	Betydning av p38-aktivering.....	58
3.4.3	Betydning av JNK-aktivering.....	60
3.4.4	Betydning av EGF-reseptor-aktivering	62
4	DISKUSJON.....	64
4.1	Etablering av kulturbetingelser	64
4.2	Frigjøring av IL-8 fra lungeceller etter eksponering med sveiserøykpartikler	65
4.3	Betydning av sveiserøykpartiklers egenskaper for observert IL-8-respons.....	66
4.4	Signalveier involvert i IL-8-respons etter eksponering for sveiserøykpartikler	70
5	KONKLUSJONER	74
6	REFERANSER.....	75

FORORD

Dette arbeidet er utført på avdeling for luftforurensning og støy, divisjon for miljømedisin ved Nasjonalt folkehelseinstitutt i tiden januar 2005 til april 2006 under fagelig hovedveiledning av Marit Låg og Magne Refsnes. Internveileder har vært Hege Thoresen ved Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo. Jeg vil takke avdelingsdirektøren på luftforurensning og støy, Per Schwarze, for å ha gitt meg muligheten til å utføre oppgaven ved avdelingen.

Jeg vil rette en selvfølgelig og stor takk til mine to veiledere, Marit Låg og Magne Refsnes, for utmerket faglig veiledning og inspirasjon under hele min periode ved avdelingen.

Ellers vil jeg også takke hele den trivelige gjengen ved avdeling for luftforurensning og støy for alle hjelpende hender og fine stunder. Tonje Skuland, Edel Lilleås og Trine Isaksen fortjener en stor takk for all teknisk opplæring og assistanse på laboratoriet. Videre vil jeg takke Hans Jørgen Dahlmann, Johan Øvrevik, Jan Inge Herseth og Leni Ekeren for gode råd og bidrag. Mine ”romkamerater” Nina Elisabeth Landvik, Vibeke Elise Ansteinsson og Annike Irene Totlandsdal fortjener også en takk for befriende diskurser og verdifulle tips.

Til slutt vil jeg berømme min bror, Erlend, for all tålmodighet, og takke min kjære Andreas for uvurderlig støtte og oppmuntring.

Oslo, april 2006

Heidi Trillerud

SAMMENDRAG

Epidemiologiske studier har vist høyere insidens av blant annet bronkitt, ”metal fume fever”, kjemisk lungebetennelse, samt irritasjon og endringer i luftveiene blant sveisere. Inflammatoriske responser i luftveiene antas å være svært viktig for utviklingen av partikkel-indusert sykdom. Sentralt i disse prosessene er produksjon og frigjøring av kjemokiner som tiltrekker immunceller til det skadede eller irriterte vevet. Kjemokinproduksjonen reguleres via en rekke ulike stress-signalveier. Disse omfatter blant annet protein tyrosin kinaser (PTK’er), som epidermal vekstfaktor-reseptor (EGFR) i cellemembranen, og sentrale intracellulære enzymgrupper som mitogen-aktiverte protein (MAP)-kinaser.

Denne studien har tatt for seg en type sveiserøykpartiklers evne til å indusere kjemokinfrigjøring fra epiteliale lungeceller og hvilke mekanismer som regulerer disse responsene. Hvilke fysiske/kjemiske egenesker som avgjør partiklenes biologiske reaktivitet er også undersøkt. Det er fokusert på effekten av sveiserøykpartiklene på en human epitelial lungecellelinje, A549. Funnene viser at sveiserøykpartiklene induserer en konsentrasjonsavhengig økning i frigjøring av kjemokinet IL-8 fra A549-cellene. IL-1 β ble derimot ikke detektert. Det ble heller ikke observert noen reduksjon i IL-8-nivå ved blokkering av IL-1-reseptor med antagonist. IL-1 β synes derfor ikke å være viktig i reguleringen av IL-8-frigjøring i A549-cellene etter eksponering for sveiserøykpartikler. Det kan synes som om induksjon av den observerte IL8-responsen er avhengig av en synergieffekt mellom komponenter i både løselig og uløselig partikkelfraksjon. Hver for seg ga fraksjonene lave responser, men gitt sammen ga de responser tilsvarende ubehandlede sveiserøykpartikler. Det er imidlertid fortsatt uklart hvilke komponenter i de ulike fraksjonene som utløser responsen. Studier av cellulære mekanismer tyder på at aktivering av EGFR og MAP-kinasen p38 er involvert i regulering av IL-8-respons etter eksponering for sveiserøykpartikler. Aktivering av JNK kan også være involvert, mens ERK1/2 synes å spille liten rolle i IL-8-frigjøringen i vårt celledsystem.

FORKORTELSER

APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovint serumalbumin
CR	Cytokin-reseptor
EDTA	Etylenglyseroltetraeddiksyre
EGF (R)	Epidermal vekstfaktor (reseptor)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	Ekstracellulært signal-regulert protein
FKS	Føtalt kalveserum
Hoechst 33342	2-[4-hydroxyfenyl]-5-[4-metyl-1-piperaziny]-2,5-bi-1H-benzamidazol
HRP	Horseradish peroxidase
IL-1 β	Interleukin-1-beta
IL-8	Interleukin-8
JNK	c-jun NH2 terminal kinase
LPS	Lipopolysakkarid
MAPK	Mitogen aktiverede proteinkinaser
mRNA	Messenger RNA
NF κ B	Nukleær faktor kappa B
p38	p38 kinase familien
PBS	Fosfatbufret saltvann
PI	Propidiumiodid
PMSF	Fenylmetylsylfonylfluorid
PTK	Protein tyrosin-kinase
ROS	Reaktive oksygenforbindelser
RTK	Reseptor tyrosinkinase
SDS	Natrium-dodecylsulfat
SDS-PAGE	Natrium-dodecylsulfatpolyakrylamid gelelektroforese

INNLEDNING

Luftforurensning i form av svevestøv øker forekomsten av uønskede helseeffekter. Epidemologiske studier viser en sammenheng mellom eksponering for svevestøv og lunge- samt hjertekarsykdom. Denne sammenhengen finner man selv ved lave konsentrasjoner av svevestøv (Brunekreef et al., 2002; Donaldson et al., 2005b; Oberdorster 2001).

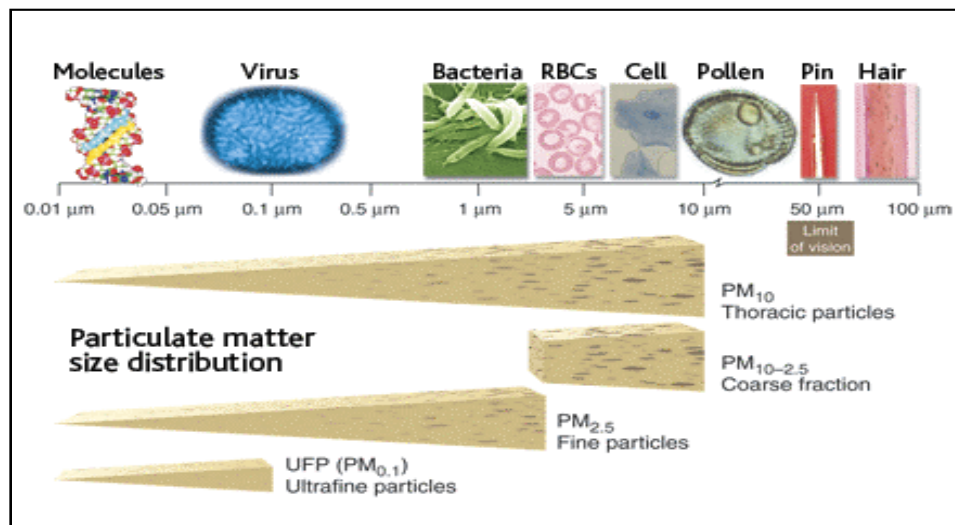
Omtrent 1 million arbeidere er ansatt som sveisere på verdensbasis. Disse er spesielt utsatt for inhalerbare irritanter i gass- og partikkelform. Sveising er en prosess der metall eller annet termoplastisk materiale spleises ved å bruke varme, trykk eller begge deler, eventuelt med tilsettmateriale. The American Welding Society har identifisert over 80 ulike sveisemetoder og beslektede prosesser i kommersiell bruk. Hver metode har sine metallurgiske og operative fordeler. I tillegg representerer de også ulike potensielle helsefarer (Antonini 2003). Det er vanskelig å sammenligne mange av de epidemologiske studiene som er gjort for å undersøke helseeffektene av sveising. Dette fordi det er store variasjoner i populasjonene, de industrielle omgivelsene, sveiseteknikkene, eksponeringsvarighet og eksponering for andre potensielt toksiske agens i tillegg til sveiserøyk. Likevel er det rapportert sammenhenger mellom eksponering for sveiserøyk og respiratoriske effekter som bronkitt, siderose og astma. (Antonini 2003).

Hvor mye sveiserøyk som dannes og hva røyken inneholder avhenger av stoffer som befinner seg i materialet det sveises på, tilsettmaterialet og eventuell maling, lakk eller annet som er brukt til behandling av overflaten. Komponentene i sveiserøyken kan være modifisert termodynamisk på grunn av den høye temperaturen eller ved fotokjemiske prosesser drevet av ultrafiolett stråling som emitteres ved sveising. Sveiseprosessen regnes for å generere konsentrasjoner av sveiserøyk i luft på mellom 100-400 mg/m³ i sveisepunktet. I innåndet luft regnes konsentrasjonen å ligge mellom 1-5 mg/m³ (Antonini et al., 2004). Når fordampede metaller reagerer med luften, produseres metalloksider som kondenserer og danner en røyk av partikler med størrelse som når lungene (Yu et al., 2000). Partikkelsammensetningen er også avhengig av sveisemetode- og teknikk.

1.1 Partikkelegenskaper

Partiklenes størrelse har stor betydning for deres helseeffekter. Hvor dypt partikler penetrerer ned i lungene avhenger av den aerodynamiske diameteren. Svevestøvpartikler er ulike når det gjelder størrelse og fasong og beskrives derfor ut i fra aerodynamisk diameter. Den aerodynamiske diameteren er forskjellig fra den geometriske diameteren og defineres som den teoretiske diameteren til en kuleformet partikkel med egenvekt 1 som vil falle like fort i luft som den egentlige partikkelen. Ulik egenvekt gir ulik aerodynamisk diameter.

Helserisiko er stort sett assosiert med svevestøvpartikler på 10 μm eller mindre. Disse refereres til som inhalerbare (Ormestad 2001). Størrelsesfordelingen til svevende partikler er trimodal og inkluderer grove ($\text{PM}_{10-2,5}$), fine ($\text{PM}_{2,5}$) og ultrafine partikler ($\text{PM}_{0,1}$), med en aerodynamisk diameter på henholdsvis 2,5-10 μm , $\leq 2,5 \mu\text{m}$ og $\leq 0,1 \mu\text{m}$. Ultrafine partikler (UFP) har relativt kortere oppholdstid i atmosfæren enn de større fordi de akkumulerer eller aggregerer og danner fine partikler (Pope, III 2000).



Figur 1: Størrelsesforhold for de ulike partikkelfraksjonene. Figuren er hentet fra Brook og medarbeidere (Brook et al., 2004).

Generelt deponeres større partikler høyere opp i luftveissystemet enn de mindre partiklene. I den senere tid har det vært en økt fokusering på de ultrafine partiklene, eller nanopartikler, som ser ut til å kunne deponeres i et stort antall over hele luftveissystemet. I tillegg har denne typen partikler et større relativt overflateareal, og regnes derfor å være mer potente til å indusere inflammatoriske prosesser (Donaldson et al., 2002a; Nemmar et al., 2005; Oberdorster 2001).

Definisjonen på nanopartikler varierer noe, men er oftest brukt om partikler i svevestøv med en aerodynamisk diameter mindre enn 100 nanometer. "Nanosized particles" (NSP) er også brukt, da som en samlebetegnelse på UFP og "engineered NP". UFP er da partikler som dannes i ukontrollerte prosesser som forbrenning, "engineered NP" er de som lages med et formål, som for eksempel ved bruk i legemidler (Oberdorster et al., 2005). Uansett så har nanopartiklene, i likhet med UFP, et stort inflammatorisk potensiale og kan translokere over til blodsirkulasjonen (Nemmar et al., 2005; Oberdorster et al., 2005; Penn et al., 2005). Omfanget og betydningen av denne translokasjonen er omdiskutert (Brown et al., 2002; Nemmar et al., 2002).

Studier har vist at sveiserøyk i sveisepunktet inneholder partikler i størrelsesorden 10-100 nm i aerodynamisk diameter. Det er imidlertid store variasjoner med type prosess og materiale som er brukt. Ved aggregering i luft vil størrelsen øke til 0,5-2,0 µm i diameter. Slike aggregater er som regel lange kjeder av primærpartikler (Taylor et al., 2003). En stor del av disse aggregatene vil deponeres i bronkioler og alveoler i lungene og vil ikke kunne fjernes effektivt av det mucociliære systemet (Antonini et al., 2004; Yu et al., 2000). Selv om aggregeringstilstanden til nanopartiklene således vil være av stor betydning både for deponering og opptak av nanopartikler, vil de ha en stor samlet overflate uavhengig av aggregering, og dermed kunne ha et stort helseskadelig potensiale.

Den kjemiske sammensetningen av sveiserøykpartiklene kan være svært kompleks, og består av både løselige og uløselige komponenter. Hovedsaklig inneholder de oksider av metaller brukt i elektrodene som anvendes i sveiseprosessen. I uteluftpartikler synes metallinnholdet å kunne være viktig for den partikkelinduserte inflammasjonen i lunge (Carter et al., 1997; Molinelli et al., 2002; Rice et al., 2001). Også for sveiserøyk synes metallene å spille en viktig rolle (McNeilly et al., 2004; McNeilly et al., 2005; Nemery 1990). Frie radikaler på partiklene, eller

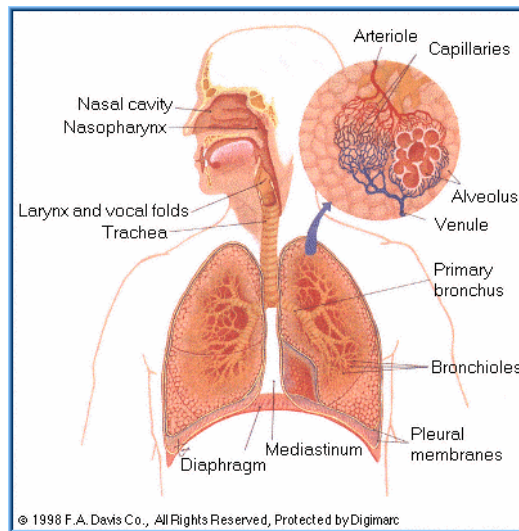
dannet intracellulært er også rapportert å være av betydning for stressresponser utløst som følge av partikkeleksponering (Antonini et al., 1999; Becker et al., 2005; Knaapen et al., 2002; Molinelli et al., 2002). Dannelse av disse radikalene er en prosess som ofte katalyseres av overgangsmetaller som for eksempel jern.

Kadmium, krom, kobolt, kobber, jern, bly, mangan, nikkel, sølv, tinn og sink er viktige metaller i sveiserøyk (Meo et al., 2003). Sveisererøykpartikler generert fra rustfrie stål-elektroder inneholder ca 20 % krom, 10 % nikkel i tillegg til jern og mangan. Partikler fra vanlig stål inneholder som regel >80 % jern, samt noe mangan, men ikke krom eller nikkel. Andre komponenter assosiert med sveising inkluderer blant annet acetylen, karbonmonoksid, oksider av nitrogen, ozon, fosgen og arsenikk.

1.2 Respirasjonssystemet

1.2.1 Anatomi

Lunge og luftveier er kroppens inngangsport for gasser, damper og partikler. Dermed er de også målorgan for mange toksiske og karsinogene stoffer. Luft transporteres til lungene via de øvre luftveiene (nesen, munnhulen og svelget) og de nedre luftveiene (strupehodet, trachea og luftrørsforgreiningene). På vei ned i lungene blir luften rensset, varmet og fuktet for å beskytte slimhinnene. Luftrøret (trachea) deler seg i to hovedbronkier (Figur 2), som igjen forgreiner seg videre til alle deler av lungene, og danner bronkialtreet. Bronkiene har flimmerepitel, slimproduserende celler og brusk i veggen. De senere forgreiningene har ikke brusk og kalles bronkioler, som forgreiner seg videre til terminale bronkioler. Videre finner man respiratoriske bronkioler og alveoleganger som munner ut i alveoler. Det er i alveolene utvekslingen av gass mellom luft og blod foregår. Her består veggen av et enkelt lag av epitelceller med en tynn basalmembran og et tett kapillærnettverk. Epitelet i de terminale bronkiolene og de videre forgreiningene er dekket av en blanding av fosfolipider og protein som kalles surfaktant. Dette er en væske som gjør overflatespenningen til væskehinnen mindre og dermed gjør at kraften som kreves for å utvide lungene ved åndedrag blir mindre.



Figur 2. Respirasjonssystemets struktur

1.2.2 Celletyper i lungene

Epitelcellelaget i lungene fungerer som en barriere mellom de inhalerte partiklene og kroppen. Derfor blir de også mål for skadelige komponenter. Epitelcellelaget i nesen, trachea, bronkiene og bronkiolene er dekket av slimproduserende celler og celler med cilier som hindrer fremmedlegemer å komme ned i lungene. I bronkiolene dominerer de ikke-cilierte Clara-cellene. Disse har sekretoriske granuler og antas å ha en viktig funksjon i reguleringen av inflammasjon i lunge. De kan dessuten proliferere og differensiere til cilierte celler og slimproduserende celler (Bishop 2004; Jeffery 1987).

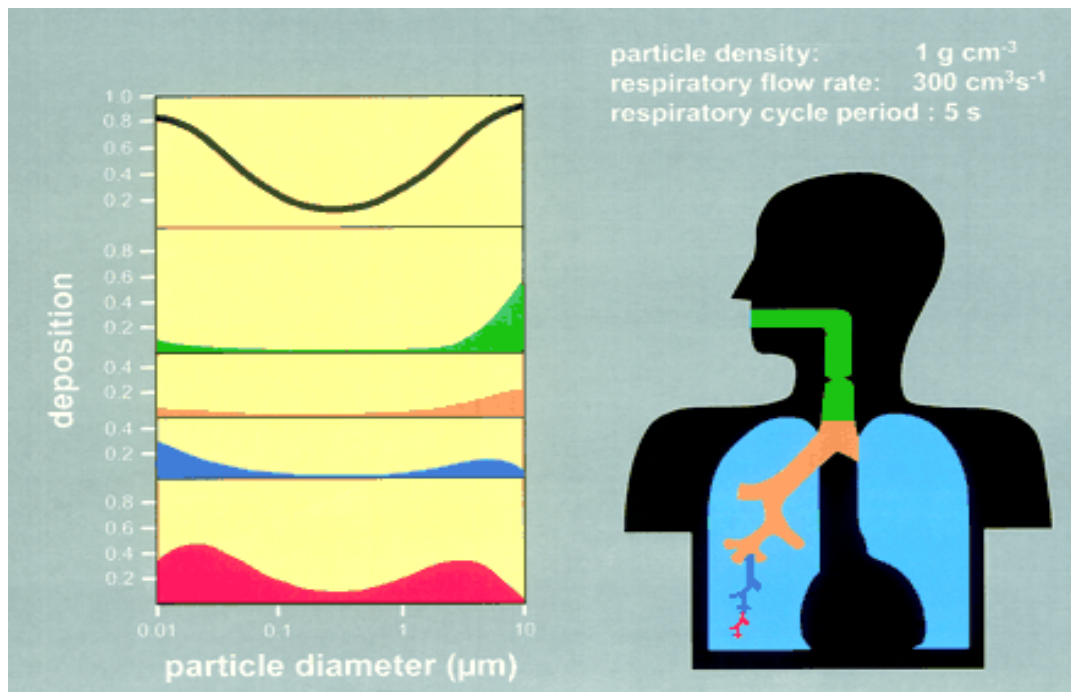
Det alveolære epitelet består av to celletyper: type 1-celler og type 2-celler. Type 1-cellene dekker omtrent 95 % av overflatearealet i alveolene, mens type 2-cellene bare dekker 5 % av overflaten. Type 1-cellene er spesialiserte celler som står for gassutvekslingen, mens type 2-cellene antas å være forløperen for type 1-cellene og erstatter aldrende og døde type 1-celler. Type 2-celler har også sekretoriske funksjoner og regulerer væskebalansen i alveolene og produserer surfaktant (Jeffery 1987). De er dessuten involvert i fagocytose av apoptotiske celler og regulering av immunresponsen. I tillegg har type 2-cellene en funksjon i T-lymfocyt-aktivering (Fehrenbach 2001).

Makrofager finnes i alle deler av luftveiene, og er svært viktige i lungenes forsvar mot inhalerte patogener og partikler. Forløperen er monocytter i blodet, som er differensiert fra stamceller i beinmargen. Makrofager finnes som intravaskulære, interstitielle, alveolære og luftveismakrofager. De inneholder blant annet lysosomale enzymer og reaktive oksygenforbindelser. Dessuten er membranen deres sterkt foldet og har mikrovilli og membranproteiner. Dette gjør makrofagene i stand til å ta opp og fordøye ulike materialer. Ved sekresjon av enzymer og mediatorer som for eksempel cytokiner, vil de kunne stimulere nærliggende epitel og starte en immunrespons (Curtis D.Klaassen 2001a).

1.2.3 Deponering og "clearance" av partikler i luftveiene

Deponering og retensjon av partikler er viktig for deres toksisitet. Partikkelstørrelse og –form er avgjørende for hvor i luftveiene partiklene avsettes. I tillegg til pustemønster (frekvens, dybde og om man puster via munn eller nese) vil luftfuktighet ha betydning. Partiklene følger luften de er suspendert i. Luftens hastighet synker etterhvert som den når dypere ned i luftveiene, og i alveolene er den tilnærmet lik null. Deponeringsmekanismene, som sedimentering, diffusjon og kollisjon, varierer dermed med hvor i lungene partikkelen befinner seg (James et al., 1994).

Partikler i størrelsesorden 0,1-1 μm i diameter vil deponeres ved sedimentering på grunn av gravitasjonskraften, men også ved diffusjon. Mindre partikler enn dette vil deponeres hovedsaklig på grunn av diffusjon og kollisjon med veggene i luftveissystemet. Avstanden en partikkel transporteres ved diffusjon synker med økende diameter, og diffusjon er ikke aktuelt for partikler med en diameter på over 1 μm . Partikler med en størrelse over 1 μm vil deponeres ved kollisjoner eller sedimentering. I de øvre luftveiene vil kollisjoner gjøre at partikler avsettes. I de nedre luftveiene, hvor hastigheten er lavere, vil sedimentering være viktig fordi gravitasjonskraften dominerer (Heyder 2004).



Figur 3. Total og regional deponering av partikler i luftveiene, fra International Commission of Radiological Protection (ICRP) deponeringsmodell for inhalasjon ved hvile. Figuren er hentet fra Heyder og medarbeidere (Heyder 2004).

”Cleareance” er prosessen hvor partikler, fibre eller andre agens fjernes fra lungene. Metoden dette foregår på avhenger av hvor i luftveiene det som skal fjernes befinner seg. I trachea, bronkiene og bronkiolene blir partiklene fjernet via mucociliene og makrofager. I alveolene finnes ikke celler med cilier, og ”clearance” vil hovedsaklig foregå ved fagocytose og transport ved alveolære makrofager, eller absorpsjon ved epitelceller og interstitielle makrofager (Curtis D.Klaassen 2001b). Partikler som når alveolene vil derfor kunne forbli der i en lengre periode.

1.3 Helseskadelige effekter av sveiserøyk

Alle sveiseprosesser gir potensiell risiko for inhalasjon av toksiske stoffer som kan føre til akutte eller kroniske respiratoriske lidelser. I følge litteraturen kan sveiserøyk føre til endret lungefunksjon, obstruktiv lungesykdom, fibrose, hoste, dyspnè, rhinitt, astma, lungebetennelse, pneumokoniose (siderose eller støvlunge med kroniske lungeforandringer) og mulig økt forekomst av lungekreft (Antonini et al., 1996; Buerke et al., 2002; Kim et al., 2005a; McNeilly et al., 2004; Ovrevik et al., 2004; Taylor et al., 2003). I tillegg er mange sveisere utsatt for irritasjon og skader av hud og øyne, utslett, grå stær samt redusert sædkvalitet og fertilitet (Antonini 2003; Meo et al., 2003). Alvorlighet, varighet og hyppighet av akutte øvre- og nedre luftveisinfeksjoner ser dessuten ut til å være større hos sveisere enn befolkningen generelt. Dessuten er det foreslått en sammenheng mellom eksponering for sveiserøyk og forekomst av kardiovaskulær sykdom (Donaldson et al., 2005a; Sjogren et al., 2002).

Tabell 1. Elementer funnet i sveiserøyk og potensiell helsefare *

Element	Anvendelse	Potensiell helsefare
Jern	Hovedkomponent i flest typer sveiserøyk	Irritasjon, siderose
Krom, nikkel	Rustfritt stål-legeringer	Lungekarsinogener
Mangan	Stållegeringer	Potensielt neurotoksin, irritant
Sink	Galvanisert stål	Metal fume fever (MFF)
Fluorider, barium	"Fluxing agents"	Lungeirritanter
Aluminium	Legering og fyllmetall	Bidrar til pnemutoksisk ozon-dannelse
Kopper, kadmium	Legering og overflatebehandling	Lungeirritanter, MFF, emfysem, lungekarsinogen (Cd)
Bly	Messing-, bronse- og stållegeringer	Potensielt neurotoksin og nyreeffekter
Tinn	Bronse- og loddelegering	MFF

* (Antonini 2003; Antonini et al., 2004; U.S.Department of Labor ©© Occupational Safety & Health Administration et al., 2006)

Den hyppigste akutte plagen blant sveisere er rapportert å være ”metal fume fever” (MFF) (Antonini et al., 2004) som følge av inhalasjon av metaller, blant andre sink og kopper (Nemery 1990). MFF er definert som en ”influensaliknende sykdom som utvikles etter inhalasjon av metall-røyk, med begynnende symptomer 3-10 timer etter eksponering”. Initielt kjennes en søt metallisk smak med påfølgende tørrhoste, skjelvinger, dyspnè, muskelsmerter, hodepine, kvalme og feber. Etterhvert utvikler arbeiderne en form for toleranse der det kreves noen dager uten eksponering for at symptomene på nytt skal oppstå (El Zein et al., 2005; Merchant et al., 2001). Patogenesen ved MFF er ikke så godt kjent, men det antas at immunologiske mekanismer ligger bak. Det er funnet økte konsentrasjoner av pro-inflammatoriske mediatorer som TNF- α , IL-8 og IL-6 i bronkoalveolærskyllevæske (BAL) i tillegg til økt antall nøytrofile granulocytter og makrofager (Antonini 2003; Blanc et al., 1993). Dette, samt utviklingen av toleranse og manglende symptomer på dager med jevn eksponering, støtter opp under denne teorien (Blount 1990; Graeme et al., 1998).

Utvikling av astma etter eksponering for sveiserøyk er blitt diskutert, og enkelttilfeller har vist at det kan være en sammenheng (Keskinen et al., 1980; Vandenplas et al., 1995). Flere rapporter har vist at nikkel (Block et al., 1982; Malo et al., 1982), krom og sinkoksid kan føre til yrkesrelatert astma (Malo et al., 1987). En sikker sammenheng er imidlertid ikke bekreftet.

1.4 Lungeinflammasjon

I eksperimentelle studier er det vist pro-inflammatoriske effekter av partikkeleksponering, både *in vivo* og *in vitro*. Flere lungesykdommer er assosiert med inflammasjon samt et misforhold mellom pro- og antioksidanter. I tillegg er det stadig flere indikasjoner på at svevestøv kan utløse og forverre inflammatorisk sykdom i luftveiene (Rahman et al., 2000).

Epitellaget i luftveiene synes å spille en viktig rolle ved aktiveringen av immunresponser. Dette involverer produksjon av flere signalmolekyler, som cytokiner, leukotriener, prostaglandiner og adhesjonsmolekyler. Disse virker i et nettverk mellom epitelceller og immunceller som makrofager, nøytrofile celler, eosinofile celler og T-hjelper celler. Disse immuncellene kan igjen

produsere cytokiner, reaktive oksygen forbindelser (ROS) og toksiske proteaser, noe som fører til frigjøring av cytokiner og kjemokiner fra epitelet og gjør at responsen opprettholdes, og kan føre til en kronisk inflammasjon.

1.4.1 Cytokiner i inflammasjonsresponsen

Cytokiner er en fellesbetegnelse for en rekke regulatoriske polypeptider som forekommer naturlig i kroppen og virker som signalmolekyler mellom celler. Selv om disse proteinene er viktige for å opprettholde kroppens homeostase, har de også en viktig rolle i utviklingen av kronisk inflammasjon ved mange typer sykdommer, inkludert astma og kronisk obstruktiv lungesykdom (KOLS) (Yamagata et al., 2006). De har vanligvis en masse på < 80 kDa og produseres fremfor alt av hvite blodceller, men også av andre celletyper. Cytokiner produseres i kroppen under immun- og inflammasjonsprosesser hvor de kan føre til en systemisk og/eller lokal effekt. De påvirker nærliggende celler og virker hovedsaklig parakrint. De kan også ha effekt på cellen som opprinnelig skilte ut cytokinet (autokrint) og de kan virke over større avstander og ha endokrin effekt. Cytokiner inngår i et større funksjonelt nettverk, hvor hvert enkelt cytokin påvirker syntese og funksjon av flere andre. Dette funksjonelle nettverket mellom cytokiner gjør at det er vanskelig å bestemme funksjonen til et enkelt cytokin (Chung 2001).

Mange cytokiner viser strukturelle likhetstrekk, og kan grupperes inn i noen få proteinfamilier, som videre kan deles inn i subfamilier:

- Hematopoetinfamilien
- Tumornekrosefaktor-familien (TNF-familien)
- Kjemokinfamilien

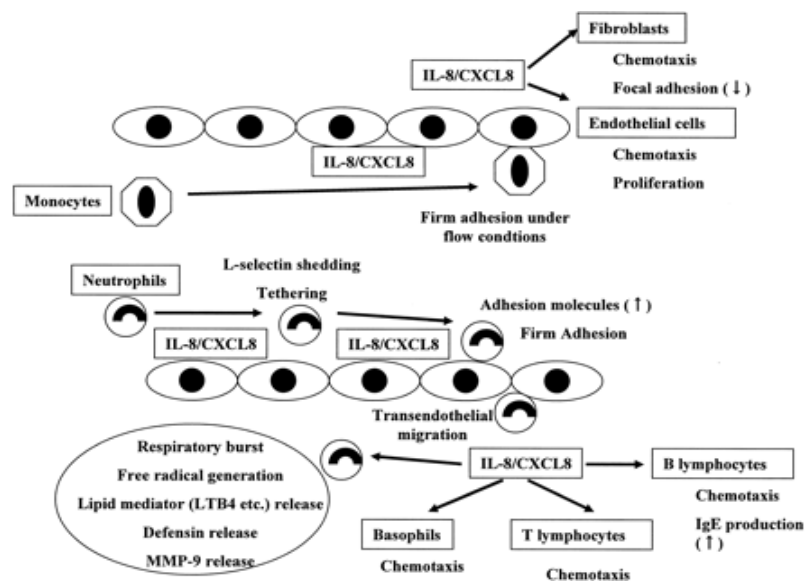
Hematopoetinfamilien er den største familien og omfatter de fleste interleukiner og interferoner, deriblant interleukin (IL) -1 og IL-6. Tumornekrosefaktor (TNF) -familien består av TNF- α , TNF- β , CD40 ligand og Fas ligand. Kjemokinfamilien er gruppe proteiner som hovedsakelig består av kjemoattraktanter. Kjemokinene er delt inn i fire subfamilier basert på hvordan noen

høyt konserverte "cystein residualer" på den N-terminale enden er arrangert (CXC-kjemokiner, CC-kjemokiner, C-kjemokiner, CX₃C-kjemokiner). CXC-kjemokiner har to cysteiner separert av en aminosyre ved N-terminal ende, i CC-kjemokinene er to cysteiner plassert ved siden av hverandre, C-kjemokinene har bare ett cystein ved N-terminalen, mens i CX₃C-kjemokinene er cysteinene skilt av 3 aminosyrer.

Kjemokinene initierer kjemotakse av immunceller. Det vil si at de regulerer migrasjon av immunkompetente celler mot områder med etablert betennelse. Kjemokiner induserer cellemigrasjon ved å binde seg til spesifikke G-protein-assosierte overflatereseptorer på målcellene. Disse vil bevege seg med en kjemisk gradient av kjemokiner. Slik binding påvirker disse cellenes motilitet og immunfunksjon. Ekspresjon av kjemokinreseptorer varierer med type immunkompetente celler (Graves et al., 1995; Laing et al., 2004; Remick 2005).

Interleukin-8

IL-8 (eller CXCL8) produseres av flere typer celler, inkludert monocytter, T-lymfocytter, nøytrofile celler, fibroblaster, endotelceller og epitelceller. IL-8 er best kjent som nøytrofil attraktant, men kan også påvirke flere funksjoner i disse cellene, som blant annet degranulering, uttrykk av adhesjonsmolekyler og adhesjon til endotelceller som ikke er stimulert (Mukaida et al., 1998). I tillegg har IL-8 flere biologiske funksjoner i andre celler (se figur). Dette kan føre til blant annet nøytrofil infiltrasjon i lunge, utvikling av ødem og ødeleggelse, svekkelse av gassutvekslingen, fortykning av alveolene og nedsatt fjerning av alveolær væske. IL-8 synes å spille en viktig rolle i flere patologiske tilstander, som kronisk inflammasjon, astma, fibrose og kreft (Mukaida 2003).



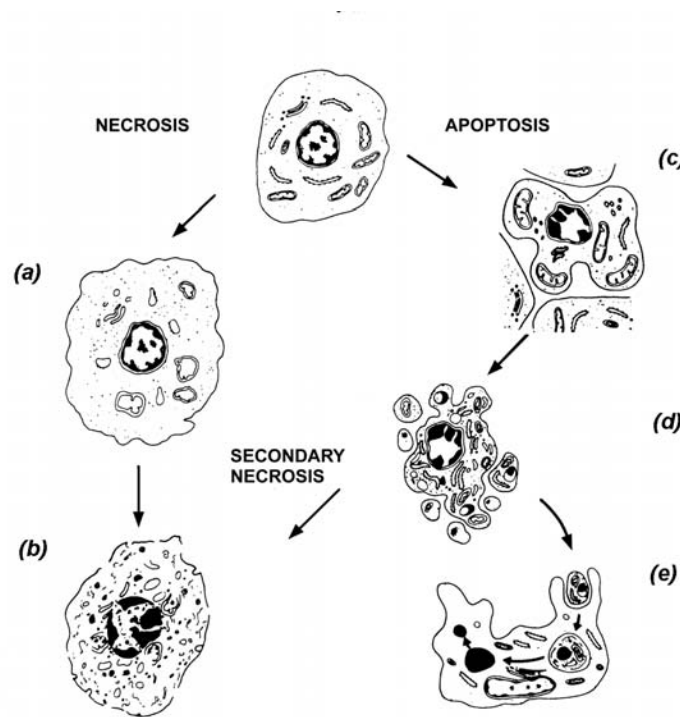
Figur 4. Viktige effekter av IL-8. Figuren er hentet fra Mukaida og medarbeidere (Mukaida 2003).

Normalt undertrykkes produksjonen av IL-8. Men ved flere typer stimuli, inkludert lipopolysakkarid (LPS), levende bakterier, ulike miljøfaktorer og proinflammatoriske cytokiner som TNF og IL-1, øker produksjonen av IL-8 (Ahmad et al., 2003; Ishii et al., 2004; Mukaida et al., 1998; Remick 2005; Yang et al., 2006).

Genet for IL-8 sitter på kromosom 4. Promoterregionen til dette genet inneholder bindingssteder for nukleær faktor (NF)- κ B (Malhotra et al., 2001), CCAAT/enhancer-bindende protein (C/EBP) og aktivator protein (AP) –1. NF- κ B binding ser ut til å være sentralt for IL-8 promoteraktiviteten i de fleste celletyper som er studert. AP-1- og C/EBP-seter ser ikke ut til å være essensielle for induksjon, men kreves derimot for maksimal genekspressjon (Chang et al., 2002; Mukaida et al., 1990).

1.5 Celledød

Døde og døende celler er vanlige i ulike vev. I normalt vev kan individuell celledød oppstå som et resultat av celle-turnover, ved utvikling av stamceller, eller som del av sykliske endringer i vev eller organer. Celledøden ved slike prosesser skjer vanligvis via apoptose, det vil si en programmert mekanisme for celledød. Ved toksisk påvirkning skjer celledød vanligvis via nekrotiske prosesser, men også apoptose kan være involvert. Nekrotiske endringer er også vanlige ved for eksempel iskemi og inflammasjon. I den senere tid er det i også fokusert på andre måter cellen kan dø på, som permanent cellyklusarrest, mitotisk katastrofe og autofagi (Okada et al., 2004). Forskning har også vist at det er noen grad av overlapp mellom de ulike formene for celledød (Lockshin et al., 2004).



Figur 5. Nekrose vs apoptose. Ved nekrose danner cellen blemmer, den sveller a) og celleinnholdet siver ut etter degradering av plasmamembranen b), noe som fører til en inflammasjonsreaksjon i nærliggende vev. Ved apoptose vil cellen krympe og løsrive seg fra nabocellene, mens cellemembranen og cellulære organeller holdes intakt c). I kjernen vil kromatinet kondensere ved kjermembranen. Til slutt vil cellen disintegrere i apoptotiske legemer som tas opp av nabocellene ved fagocytose d), evt gå i nekrose d) → b) (W.M.Blom 2003)

Den mest vanlige og veldefinerte form for programmert celledød er apoptose, som er et fysiologisk "celle-selv mord". Apoptose medieres av dødsreseptorer i cellemembranen eller via mitokondriene. De apoptotiske cellene blir fagocyttert av naboceller eller immunceller og vil ikke gi inflammasjon. Selv om ikke apoptose forårsaker inflammasjon, kan apoptotisk celledød være viktig for utvikling av inflammasjonsprosessen. Celler som ikke blir fjernet ved fagocytose, eller ikke har nok energi til å gjennomføre apoptosen, vil gå over i nekrose (Edinger et al., 2004; Raffray et al., 1997). Apoptose sammenlignes ofte med nekrose i litteraturen. Nekrose er betraktet som en passiv og ukontrollert dødsform og kjennetegnes blant annet ved at cellene er ute av stand til å produsere energi (ATP), noe som kreves for å kunne opprettholde homeostase. Apoptose derimot er en energikrevende prosess som er avhengig av proteinsyntese og/eller aktivering av allerede eksisterende proteiner og signalmolekyler som resulterer i fragmentering, kondensering av DNA, tap av mitokondrienes membranpotensial og dannelselse av apoptotiske legemer. Nekrotiske celler danner vakuoler, sveller, og ender opp med å sprekke slik at celleinnholdet siver ut ekstracellulært og kan påvirke naboceller og gi inflammasjon (Raffray et al., 1997).

1.6 Signalveier i inflammasjonsresponsen

Cytokiner og adhesjonsmolekyler er produkter av inflammatoriske gener. I de siste årene er signalmekanismene involvert i inflammatorisk genekspressjon blitt delvis identifisert (Hommes et al., 2003). I kjølvannet av dette følger et nytt område for forskningen, nemlig farmakologisk regulering av signaliseringen.

1.6.1 Mitogen aktiverte protein (MAP)-kinaser

MAP-kinaser, som hører til en stor familie av serin/threonin-kinaser, er et konvergenspunkt for flere inflammatoriske signalveier fra celleoverflaten inn i cellekjernen. Ved fosforylering av serin- og threonin-enheten vil disse enzymene aktivere andre intracellulære proteiner. Selv aktiveres de ved dual fosforylering på threonin- og tyrosin-enheter, og krever derfor oppstrøms

kinaser med todelt spesifisitet, kjent som MAP/ERK (MEK)-kinaser eller MAP-kinase kinaser (MAPKK). MAPKK'er er igjen kontrollert av MAP-kinase-kinase kinaser (MAPKKKer) (Ahmad et al., 2003; Hoefen et al., 2002; Qi et al., 2005; Schramek 2002; van Drogen et al., 2002). MAPKKKene kan aktiveres via aktivering og/eller interaksjon med små GTP-bindende proteiner som Ras/Rho.

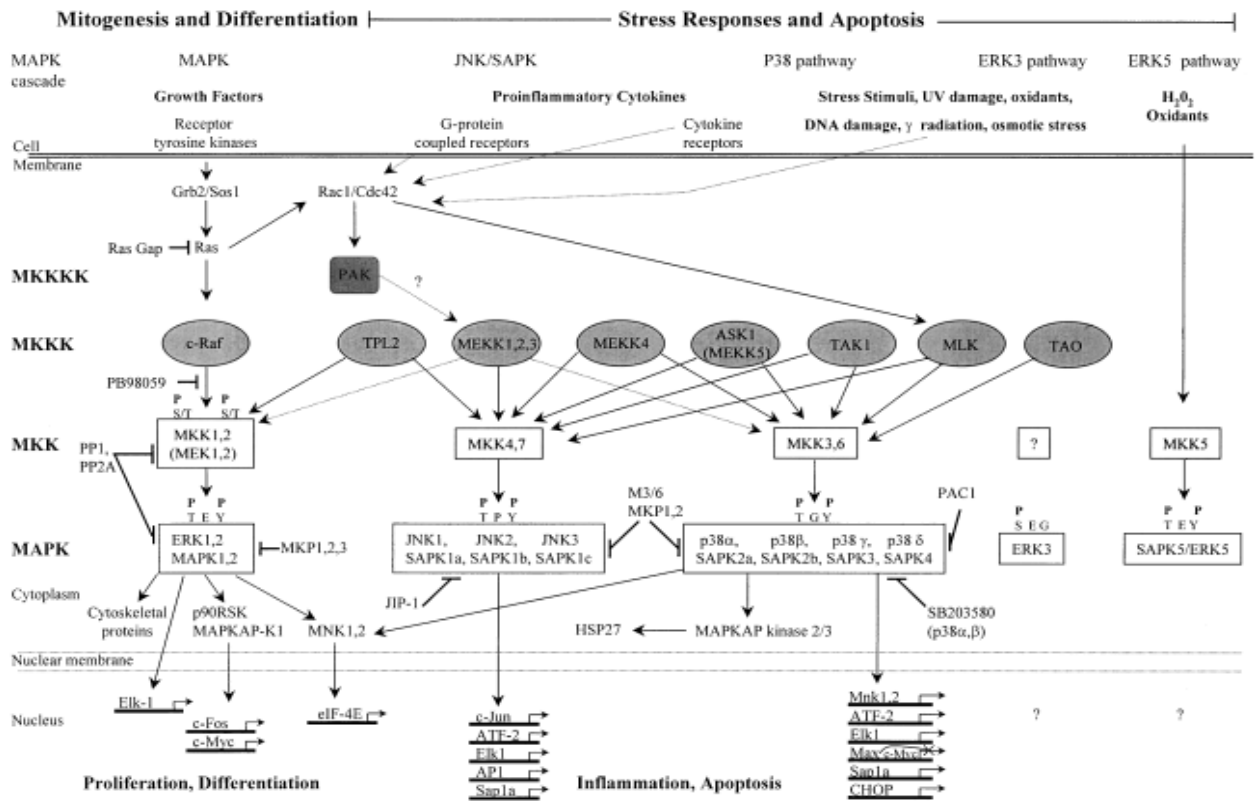
MAP-kinasene aktiveres som en respons på ekstracellulær stimuli, som for eksempel vekstfaktorer, hormoner, oksidanter, toksiner og fysisk stress. Interaksjoner mellom de ulike kinasenes kaskader og at de i tillegg har noe overlappende substratspesifisitet, modulerer responsen og er viktig for sluttresponsene (Hommes et al., 2003).

MAPK superfamilien består hovedsakelig av tre subfamilier:

- Ekstracellulært signal-regulerte protein kinaser (ERK)
- P38 kinase familien (p38)
- c-jun NH2-terminal kinase (JNK)

ERK modulen (Ekstracellulært signalregulerte-kinaser)

Generelt aktiveres ERK1/2 av serum, vekstfaktorer, cytokiner og stress, for å nevne noe (Pearson et al., 2001). Aktivering av Raf/MEK/ERK- kaskaden skjer hovedsakelig via G-protein-koblede reseptorer eller reseptor tyrosin-kinaser (RTK). ERK aktiverer en rekke substrater avhengig av type stimuli og celletype. Generelt er aktivering av ERK involvert i aktivering og regulering av gener og transkripsjonsfaktorer involvert i migrasjon, overlevelse og celledeling (Hommes et al., 2003; Roux et al., 2004). ERK er også vist å være involvert i ulike inflammatoriske prosesser (Hommes et al., 2003).



Figur 6. Illustrasjon av MAP-kinase kaskadene. Direkte (hele linjer) og indirekte (stiplede linjer) aktivering av de ulike MAP-kinasene via ekstracellulær stimuli som vekstfaktorer, cytokiner og osmotisk stress. Figuren angir også aktivering av ulike transkripsjonsfaktorer og betydning for proliferasjon, differensiering, inflammasjon og apoptose. Figuren er hentet fra Puddicombe og medarbeidere (Puddicombe et al., 2000)

P38 modulen

P38 familien består av flere isoformer (p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ). P38 har mange likheter med de andre MAP-kinase kaskadene, og er sentral i inflammasjon, samt cellevekst, -differensiering og -død. P38 aktiveres ved blant annet stråling, oksidativt stress, LPS og cytokiner, som IL-1 og TNF α (Hashimoto et al., 1999; Raingeaud et al., 1996). Målsubstrater og funksjon varierer mellom isoformene, og det er stor grad av overlapp med andre signalveier, som ERK og JNK. Aktivert p38 er vist å fosforylere flere substrater, både cytosoliske proteiner og

transkripsjonsfaktorer, som for eksempel NF- κ B (Hommes et al., 2003; Obata et al., 2000). Slik aktivering ser ut til å ha en viktig rolle i apoptose, cytokin-produksjon, regulering av transkripsjon og reorganisering av cytoskjelettet. P38 MAP-kinase signalveien kan øke ekspresjon av gener via aktivering av transkripsjonsfaktorer, men kan også ha regulatoriske effekter, som via modulering av mRNA-prosessering, eksport fra kjerne samt mRNA- og proteinstabilitet (Raingeaud et al., 1996). P38-aktivering er dessuten rapportert å være innblandet ved sepsis, iskemisk hjertesykdom, artritt, HIV-infeksjon og Alzheimers sykdom (Obata et al., 2000).

JNK-modulen

Det er identifisert tre mammalske isoformer av JNK; JNK1, JNK2 og JNK3. Aktivering av JNK skjer ved cytokiner, UV-stråling, mangel på vekstfaktorer, DNA-skadende agens og i liten grad noen G-protein-koplede reseptorer, serum og vekstfaktorer. Også her varierer målsubstratene med isoformene. JNK er også assosiert med transkripsjon og regulering av et stort antall gener, deriblant gener involvert i apoptose, celledifferensiering og produksjon av cytokiner (Hommes et al., 2003; Puddicombe et al., 2000).

1.6.2 Membran-reseptorer

Protein tyrosin-kinaser finnes både som intracellulære enzymer og som reseptorer i cellemembranen. De er involvert i reguleringen av en rekke cellulære funksjoner, blant annet celledeling, apoptose og angiogenese, så vel som organutvikling (for eksempel utvikling og vekst av epidermalt derivert vev) (Sato et al., 2003). Protein tyrosin-kinaser (PTKer) er ofte rapportert å være involvert i de tidlige stadiene av intracellulær signalisering som regulerer IL-8 frigjøring (Hamilton et al., 2003; Wu et al., 2001). PTKer er delt inn i reseptor-PTKer og ikke-reseptor-PTKer, med henholdsvis epidermal vekstfaktor-reseptor (EGFR) og Src familie-kinaser (SFKer) som prototypene i de respektive gruppene.

EGF-reseptorfamilien har fire medlemmer (ErbB1-4, eller HER1-4). Reseptoren består av et ekstracellulært ligand-bindende domene, en transmembran α -heliks, et intracellulært tyrosin-kinase domene og en COOH-terminal region med autofosforylerende seter. EGFR regulerer blant annet de intracellulære effektene av EGF og ”transforming” vekstfaktor (TGF)- α . Da gjennomgår EGFR homo-og heterodimerisering og aktivering av reseptorens tyrosin-kinase aktivitet (Wu et al., 2002a). Det er også vist at EGFR er involvert i signalisering induisert av flere typer stimuli, og at denne signalveien har stor betydning ved aktivering av ERK1/2 (Wu et al., 2002b). EGFR kan også aktiveres ved partikkeleksponering. Mye tyder på at denne reseptoren er involvert i aktivering av ERK1/2 og cytokinfrigjøring. Denne reseptoren svært ligand-spesifikk og interaksjon mellom partikkel og EGFR kan vanskelig forklares. En mer sannsynlig forklaring er aktivering via andre mekanismer. EGFR kan også aktiveres av ROS eller metaller.

I tillegg til EGFR er partikler vist å interagere med flere andre ulike reseptorer på celleoverflaten. Blant annet er ”scavenger”-reseptorer (SR) vist å være involvert i partikkelbinding og -opptak. Cellulære responser på binding av ligander til SR inkluderer økt intracellulært ROS dannelse, aktivering av PTKer, MAP-kinaser, NF- κ B og AP-1, og økt cytokindannelse og apoptose (Hsu et al., 2001). I motsetning til EGFR er ikke SR særlig ligand-spesifikk, og det kan derfor tenkes en direkte interaksjon mellom reseptor og partikkel.

SFK-familien aktiveres ved at ligander binder til ulike klasser reseptorer på celleoverflaten, inkludert immunoreseptorer, integriner, adhesjonsmolekyler, cytokinreseptorer, G-proteinkoplede reseptorer og reseptor PTKer. De deltar også i signalveier som regulerer flere reseptor-medierte biologiske aktiviteter. Mye tyder på at SFKer, og da spesielt c-Src, er involvert i EGFR signalisering. Src kan være både en aktivator av EGFR (Luttrell et al., 1996) og ansvarlig for signaler nedstrøms for EGFR (Kitagawa et al., 2002; Sato et al., 2003). Når det gjelder proinflammatoriske reaksjoner, har SFKer vist å bidra til aktivering av NF- κ B, MAP-kinaser og cytokinfrigjøring som respons på ulik ekstracellulær stimuli, eksempelvis ultrafiolett stråling (Kitagawa et al., 2002) og oksidativt stress. Det er vist at c-Src kan være involvert i aktivering av p38 (Jiang et al., 1998; Mocsai et al., 2000; Ovrevik et al., 2004). P38 er dessuten vist å ha effekt på c-Src (Volonte et al., 2001).

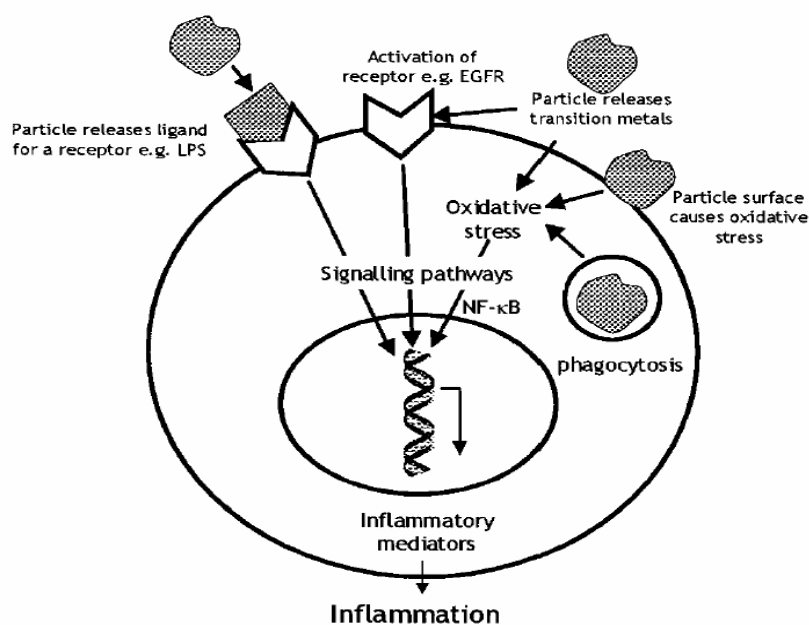
1.7 Sveiserøyk og inflammasjon

Sveiserøykpartikler kan forårsake inflammasjon i luftveiene. Hvilke komponenter i partiklene som er årsak til dette er usikkert. Flere studier har vist at det er den løselige delen av sveiserøykpartiklene som har størst inflammatorisk potensiale (Antonini et al., 1999; Antonini et al., 2005; Knaapen 2000; McNeilly et al., 2004; McNeilly et al., 2005; Soukup et al., 2000). Andre studier tyder på at toksisitet og inflammatorisk respons skyldes både løselig og uløselig fraksjon (Antonini et al., 2004; Ghio et al., 1999; Knaapen et al., 2002; Taylor et al., 2003). Den store variasjonen i data skyldes trolig store variasjoner i materialsammensetning og sveisemetoder, som vil generere partikler av ulike kombinasjoner og ulike oksidasjonstilstander (McNeilly et al., 2004). Det er i flere tilfeller vist at sveising på rustfritt stål genererer sveiserøykpartikler som har lang retensjonstid og stort inflammatorisk potensial i lunge (Antonini et al., 1997; Antonini et al., 2004; White et al., 1983).

Metaller kan sitte løst bundet til partikkeloverflaten og kan dessuten være en del av partikkelstrukturen som oksider (Ghio et al., 1999). Det er godt dokumentert at metaller har evne til å indusere en inflammatorisk respons. For overgangsmetallenes del synes toksisitet og inflammatorisk potensiale for en stor del å skyldes evnen til å eksistere med ulike valenstall og kunne danne ROS. Metaller i kombinasjon vil dessuten kunne gi andre effekter enn metallene enkeltvis (Antonini et al., 1999; Becker et al., 2005; Riley et al., 2003). Overgangsmetaller og ROS er vist å føre til aktivering av transkripsjonsfaktorer og ekspresjon av pro-inflammatoriske cytokiner (Donaldson et al., 2002b; Knaapen et al., 2002; McNeilly et al., 2005; Rice et al., 2001; Riley et al., 2003). Det samme er endotoksiner, organiske og uorganiske forbindelser, gasser, og allergener som kan være festet til partikkeloverflaten. I hvilken grad disse ulike komponentene bidrar til den inflammatoriske responsen på sveiserøykpartiklene er uklart..

Oksygen radikaler og deres metabolitter (ROS), er vist å spille en stor rolle i utvikling av lungetoksisitet og inflammasjon som følge av eksponering for ulike typer partikler (Hashimoto et al., 2000; Vallyathan et al., 1997). Det er imidlertid vist at ferske sveiserøykpartikler har større inflammatorisk potensiale enn eldre partikler, og at dette kan skyldes høyere konsentrasjoner av ROS på de ferske partiklene (Antonini et al., 1996; Antonini et al., 1998). Respons på oksidativt

stress som følge av partikkeleksponering kan være en konsekvens av reseptor-avhengige mekanismer, opptak av hele partikkelkjerner eller direkte effekt på cellemembran. Dette kan igjen føre til aktivering av proinflammatoriske gener (Figur 7). Disse genene er regulert av redoks-sensitive transkripsjonsfaktorer som NF- κ B, AP-1 og C/EBP og kontrollerer ekspresjon av cytokiner som IL-6, IL-8 og TNF (Gonzalez-Flecha 2004). Bortsett fra dokumentert aktivering av NF- κ B og AP-1 via oksidativt stress (McNeilly et al., 2004; McNeilly et al., 2005) er det gjort lite studier på intracellulære mekanismer ved inflammatoriske responser i epiteliale lungeceller som følge av eksponering for sveiserøyk.



Figur 7. Partikkel/celle-interaksjoner som kan føre til ekspresjon av inflammatoriske gener. Figuren er hentet fra Donaldson og medarbeidere (Donaldson et al., 2002b)

1.8 Mål for oppgaven

Epidemiologiske data viser at eksponering for sveiserøyk gir økt risiko for sykelighet. Flere studier viser at sveiserøyk er i stand til å indusere inflammatoriske responser i lungeceller *in vivo* og *in vitro*. Hvilke partikkelegenskaper og intracellulære mekanismer som er ansvarlig for denne responsen er fortsatt uklart.

Hovedmålet med denne oppgaven er å studere potensialet sveiserøykpartikler har til å utløse inflammatoriske responser i epiteliale lungeceller, nærmere bestemt A549-cellekulturer.

Delmål:

- Optimalisere dyrkningsbetingelser for eksponering av A549-cellekulturer med sveiserøykpartikler.
- Fastsette konsentrasjonseffekt-forholdene for frigjøring av kjemokinet IL-8 i cellekulturene etter eksponering for sveiserøykpartikler.
- Undersøke om IL-1 frigjøring er av betydning for frigjøring av IL-8 etter eksponering for sveiserøykpartikler.
- Undersøke hvilke komponenter i sveiserøykpartiklene som er ansvarlige for eventuell IL-8-respons, og om disse komponentene sitter i løselig eller uløselig fraksjon.
- Undersøke om EGFR og MAP-kinasene, ERK, p38 og JNK, er involvert i IL-8-responsen etter eksponering for sveiserøykpartiklene.

MATERIALER OG METODER

1.9 Materialer

<u>Produkt</u>	<u>Produsent</u>
3, 3', 5, 5'-Tetrametylbenzidin (TMB)	Merck (Darmstadt, Tyskland)
Acrylamid/metylenbisacrylamid (ACAMB)	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
AG 1478 (4-(3-kloranilino)-6-7-dimetoxyquinazolin)	Calbiochem-Novabiochem Corporation (La Jolla, CA, USA)
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
Amphotericin (Fungizone)	Bristol-Myer Squibb (Bromma, Sverige)
Ampicillin (Pentrexyl)	Bristol-Myer Squibb (Bromma, Sverige)
Aprotenin	Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)
Bio-Rad Dc Protein Assay, Reagent A	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
Bio-Rad Dc Protein Assay, Reagent B	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
Bio-Rad Dc Protein Assay, Reagent S	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
Bovint serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)
Bromfenolblått	Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)
Chelex	Fluka (Buchs, Sveits)
Complete protease inhibitor	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Tyskland)
Dimetylsulfoksid (DMSO)	Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)
EDTA (Etylenglyseroltetraeddiksyre)	Merck (Darmstadt, Tyskland)

Epidermal vekstfaktor (EGF)	Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)
Etylenglykolbis-(b-aminoetyl) N, N, N', N'-tetraacetat (EGTA)	Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)
Fosfatbufret saltløsning (PBS)	Nasjonalt folkehelseinstitutt (Oslo, Norge)
Føtalt kalveserum (FKS)	GibcoBRL (England)
Glyserol 87%	Merck (Darmstadt, Tyskland)
Hoechst 33342 (bisbenzimid)	Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)
Hydrogenperoksid (H ₂ O ₂)	Merck (Darmstadt, Tyskland)
IL-1 reseptor antagonist (anakinra, Kineret®)	Amgen Inc. (Thousand Oaks, CA, USA)
Isopropanol	Arcus produkter (Oslo, Norge)
Kodak AL 4-X-ray fikseringsvæske	Kodak Norge (Kolbotn, Norge)
Kodak LX 24 X-ray fremkallingsvæske	Kodak Norge (Kolbotn, Norge)
Leupeptin	Amersham Pharmacia Biotech AB (Uppsala, Sverige)
Metanol	Merck (Darmstadt, Tyskland)
N,N,N,N-tetra-metyl-etylendiamin (TEMED)	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
Natrium-dodecylsulfat (SDS)	Fluka (Buchs, Sveits)
Natriumfluorid (NaF)	Riedel-de Haën AG (Seelze, Hannover, Tyskland)
Natriumhydrogenkarbonat (NaHCO ₃)	Merck (Darmstadt, Tyskland)
Natriumklorid (NaCl)	Merck (Darmstadt, Tyskland)
Natriumorthovandat (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)
Natriumpyrofosfat (Na ₄ P ₂ O ₇)	Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)

PD 98059 (2'-amino-3'-metoxyflavon, C ₁₆ H ₁₃ NO ₃)	Calbiochem-Novabiochem Corporation (La Jolla, CA, USA)
Penicillin/Streptomycin (Pen-Strep)	Bio Whittaker (Walkersville, MD, USA)
Pepstatin A	Calbiochem-Novabiochem Corporation (La Jolla, CA, USA)
Phenylmetylsulfonylfluorid (PMSF)	Merck (Darmstadt, Tyskland)
Polymyxin B sulfat	Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)
Ponceau S	Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)
Propidiumjodid (PI)	Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)
Restore Western Blot Stripping Buffer	Perbio (Rockford, IL,USA)
SB 202190 (4-(4fluorophenyl)-2-(4-hydroxyphenyl))	Calbiochem-Novabiochem Corporation (La Jolla, CA, USA)
SP 600125 (anthra[1,9-cd]pyrazol-6(2H)-on, C ₁₄ H ₈ N ₂ O)	BioSource International, Inc. (Camarillo, CA, USA)
Supersignal West Dura Extended Duration	Perbio (Rockford, IL,USA)
Triklorediksyre	Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)
Triton X-100	Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)
Trizma-base (Tris-base)	Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)
Trypsin, fra kalve-pankreas	Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)
Trypsininhibitor (SBT-1)	Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)
Tween 20	Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)
Tørrmelk	Nestle A/S (Sandvika, Norge)
β-Mercaptoetanol	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)

<u>Antistoffer</u>	
Dynabeads M-280 sau anti-kanin IgG	Dynal Biotech ASA (Oslo, Norge)
Monoklonalt anti- β -aktin	Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)
Polyklonalt kanin anti-EGFR antistoff	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
Primærantistoff; monoklonalt mus anti-fosfotyrosin (P-Tyr-100)	Cell Signaling Technology Inc. (Beverly, MA, USA)
Primærantistoff; monoklonalt mus anti-fosfo ERK	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
Primærantistoff; polyklonalt kanin anti-ERK2	Cell Signaling Technology Inc. (Beverly, MA, USA)
Primærantistoff; polyklonalt kanin anti-fosfo p38	Cell Signaling Technology Inc. (Beverly, MA, USA)
Primærantistoff; polyklonalt kanin anti-JNK	Cell Signaling Technology Inc. (Beverly, MA, USA)
Primærantistoff; polyklonalt kanin anti-p38	Cell Signaling Technology Inc. (Beverly, MA, USA)
Primærantistoff; polyklonalt mus anti-fosfo JNK	Upstate Group Inc. (Charlottesville, VA, USA)
Sekundærantistoff; polyklonalt HRP-konjugert kanin anti-mus	DAKO A/S (Glostrup, Danmark)
Sekundærantistoff; polyklonalt HRP-konjugert mus anti-kanin	DAKO A/S (Glostrup, Danmark)
<u>Medium</u>	
Nutrition Mixture F12 HAM Kaigin's modification (F12K)	Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)
<u>Kit</u>	
Cytokine ELISA assay for humant IL-8	Biosource International (Camarillo, CA, USA)
Biorad DC Protein Assay	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
Duoset ELISA Development System for humant IL-1 β	R&D Systems Europe Lt.d. (Minneapolis, MN, USA)

<u>Diverse</u>	
6-brønners brett	Corning Inc. (Kittery, Maine, USA)
Celledyrkningsskåler	Nunc A/S (Roskilde, Danmark)
Flourescensmikroskop	Olympus1X81
Mikroplateleser MR700	Dynatech (Guernsey, England)
Hyperfilm ECL	Amersham (Buckinghamshire)
Partikler	Gave fra Jon Ayres, University of Aberdeen

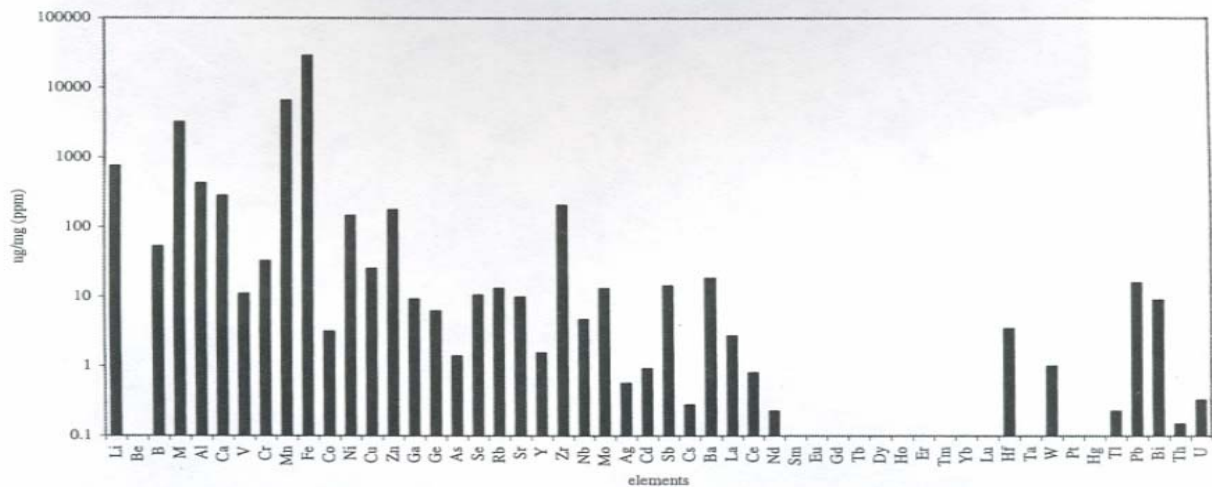
1.10 Metoder

1.10.1 Celler og dyrkningsbetingelser

Cellelinjen som ble benyttet var A549-celler fra American Tissue Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Dette er en human cellelinje som stammer fra humant lungeadenocarcinom og har trolig utgangspunkt i epiteliale type 2-celler (Bortnick et al., 2003; Vallyathan et al., 1997). Det er vist at disse cellene kan ta opp ultrafine partikler, gjerne som aggregater via endocytose (Stearns et al., 2001). Cellene ble sådd ut i 6-brønners brett med brønner på 35 mm i diameter, eller i skåler med en diameter på 90 mm. De ble dyrket ved 37 °C i inkubator med fuktig atmosfære og 5 % CO₂ i F12K-medium. Før eksponeringsstart (20 t) ble cellene tilsatt serumfritt F12K-medium med ampicillin (100 µg/ml), penicillin/streptomycin (hhv 250 µg/ml/ og 250 IE/ml), amphotericin (0,5 µg/ml). Forsøk ble startet etter at celletettheten hadde nådd 70-80 % av konfluens.

1.10.2 Partikler

Partiklene som ble brukt var sveiserøykpartikler med en aerodynamisk diameter på ~200 nm. Sveiserøykpartiklene er rike på mange metaller, men inneholder mest jern, mangan og magnesium (Figur 8). F12K-medium uten serum ble brukt til å løse partiklene som ble rørt over natt før de ble brukt til eksponering. Konsentrasjonen av partiklene i stamløsningen var 5 mg/ml.



Figur 8. Metallinnholdet i de benyttede sveiserøykpartiklene.

1.10.3 Eksponeringsbetingelser

Som generell prosedyre ble mediet tatt av og cellene vasket med PBS 20 timer før eksponering. Deretter ble serumfrittmedium som beskrevet under dyrkningsbetingelser tilsatt cellekulturene. Bovint serum-albumin (BSA) ble tilsatt 4 timer etter start. Konsentrasjonen av BSA ble etter initiale utprøvinger valgt til 0,5 %. Cellene ble inkubert i 20 timer ved 37 °C etter eksponering. Før eksponering ble partikkelsuspensjonen rørt over natt.

Sammenligning av serum og albumin

Under optimalisering av eksponeringsbetingelsene ble cellene tilsatt enten føtalt kalveserum (FKS) eller BSA ved eksponeringsstart, eller 4 timer etter. Cellekulturene ble eksponert for partikkelkonsentrasjoner på 25-800 µg/ml.

Uttesting av ulike BSA-konsentrasjoner

Ved optimalisering av eksponeringsbetingelsene ble også cellene tilsatt ulike konsentrasjoner (0,1, 0,5 og 1 %) BSA ved eksponeringsstart, eller 4 timer etter. Cellekulturene ble eksponert for 100-800 µg/ml sveiserøykpartikler.

Bruk av IL—reseptor- antagonist

Medium ble tilsatt IL-1-reseptor-antagonist (IL-1ra) i en konsentrasjon på 15 µg/ml. Medium med og uten IL-1ra ble tilsatt cellene 0,5 time før partikkeleksponering. Deretter ble cellene eksponert for 500 µg/ml partikkelsuspensjon eller medium i tilsvarende volum.

Vasket/løselig fraksjon av partikler

Etter at stamløsningen hadde rørt over natt ble den sentrifugert 3 ganger ved 2500 xg i 5 min. Mellom hver sentrifugering ble bunnfallet vasket med serumfritt medium. Denne fraksjonen kalles videre for vasket fraksjon. Supernatanten ble tatt av og sentrifugert 3 ganger ved 2500 xg for å fjerne den uløselige delen av partiklene, slik at kun den løselige delen av partiklene var igjen i løsningen. Denne partikkelfraksjonen blir kalt løselig fraksjon. Cellene ble eksponert for ubehandlet partikkelsuspensjon, vasket fraksjon (partikkelkjerne) og løselig fraksjon tilsvarende en konsentrasjon på 500 µg/ml partikkelsuspensjon. I tillegg ble cellene eksponert for en kombinasjon av løselig og vasket fraksjon.

Chelex-behandling av partikkelsuspensjonen

Cellene ble eksponert som beskrevet under forrige punkt. I tillegg ble en del av partikkelsuspensjonen behandlet med 50 mg/ml chelex-kuler ved 4 timers omrøring i romtemperatur. Etter sentrifugering 3 ganger ved 2500 xg i 5 min, ble cellene eksponert for supernatant. Denne chelex-behandlede supernatanten ble også kombinert med de vaskede partiklene fra partikkelsuspensjonen som ikke var behandlet med chelex. Cellene ble eksponert for denne kombinasjonen tilsvarende en konsentrasjon på 500 µg/ml partikkelsuspensjon

Bruk av ulike enzymhemmere

Hemmere ble brukt for å undersøke om responsene (IL-8-respons og viabilitet) ble lavere ved å blokkere fosforylering av ulike MAP kinaser og EGF reseptor. De ble tilsatt 30 min før eksponering for 500 µg/ml partikkelsuspensjon. Hemmerne som ble prøvet ut var ERK1/2-hemmeren PD 98059 (10 og 20 µM), p38-hemmeren SB 202190 (5 og 10 µM), JNK-hemmeren SP 600125 (10 og 20 µM) og EGFR-hemmeren AG 1478 (10 og 20 µM).

Aktivering av MAP- kinaser og EGFR

A549-celler ble eksponert i skåler med sveiserøykpartikler i en konsentrasjon på 500 µg/ml. Deretter ble cellene tatt av etter 5 min, 30 min, 2 timer og 4 timer. Fosforylering av MAP-kinasene ble detektert ved Western blotting og EGFR ved immunopresipitering og påfølgende Western blotting. Som positiv kontroll for MAP-kinase-aktivering ble cellene eksponert med 2,5 mM NaF i 30 min. Som positiv kontroll ved immunopresipitering ble EGF brukt i 15 min ved en konsentrasjon på 10 ng/ml.

1.10.4 Bestemmelse av viabilitet ved fluorescensmikroskopi

Ved å farge med ulike fluorokromer er det mulig å skille mellom apoptotiske, nekrotiske og levende celler. Dette fordi plasmamembranens egenskaper, og dermed opptak av ulike stoffer, endres ved celledød. Etter farging med Hoechst 33342 kan kromatinkondensering og kjernefragmentering karakteristisk for apoptose observeres i et fluorescensmikroskop ved en blå farge. Kationiske fargestoffer som propidiumjodid (PI) vil ikke tas opp av celler med intakt plasmamembran (Darzynkiewicz et al., 1997). Derimot vil DNA i kjernen i nekrotiske celler ta opp PI, noe som kan registreres i et fluorescensmikroskop ved en rød farge. Dette kan brukes til å skille viable, apoptotiske, apoptotisk/nekrotiske og nekrotiske celler.

Prosedyre

Relativt tidlig i apoptoseprosessen vil cellene løsne fra overflaten i brønnene. Derfor ble analysene utført på en blanding av løse celler i mediet og cellene som satt fast i brønnen. Mediet ble suget av brønnene som så ble vasket med fosfatbufret saltvann uten Ca^{2+} og Mg^{2+} (PBS) for å fjerne rester av serum. Deretter ble brønnene inkubert med trypsinløsning i 2 min ved 37 °C. Brettene ble banket slik at cellene løsnet. FKS blandet med PBS ble tilsatt for å inaktivere trypsinet. Celler i mediet og trypsinerte celler ble kombinert.

Cellesuspensjoner ble tilsatt PI (5 µg/ml) og Hoechst 33342 (10 µg/ml) og inkubert mørkt ved romtemperatur i 30 min. Preparatene ble telt i et fluorescensmikroskop med UV-filter. Andelen apoptotiske og apoptotisk/nekrotiske celler var svært lav og ble ikke kvantifisert. Cellene ble derfor bare delt inn i levende (PI-negative) og døde (PI-positive). Viabiliteten ble angitt som prosent PI-negative celler av totalt celletall. Det ble telt mellom 3- og 400 celler.

1.10.5 Måling av cytokiner ved Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

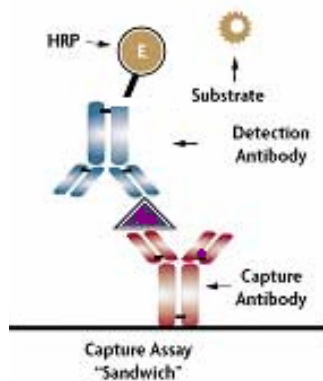
Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) er en biokjemisk teknikk brukt til å detektere antistoff eller antigen i en prøve. Tre metoder danner basis for alle typer ELISA. Disse er direkte, indirekte og ”sandwich” ELISA. De tre typene kan igjen brukes i systemer kalt kompetitiv eller inhiberende ELISA. I denne oppgaven er det brukt et ”sandwich”-system (J.R.Crowther 2006). Det brukes to antistoffer som er spesifikke for antigenet; ett er et såkalt ”capture”-antistoff som binder til bunnen av brønnene. Prøvene settes til brønnene med ”capture”-antistoffet, som vil danne kompleks med antigenet (IL-8) i prøvene. Til komplekset mellom ”capture”-antistoff og antigen i prøven vil deteksjonsantistoffet kunne feste seg via spesifikk binding til antigenet. Streptavidin koblet til et enzym, derav navnet enzyme-linked, vil kunne binde til dette komplekset (se Figur 9). Enzymet koblet til deteksjonsantistoffet kan omdanne et kromogent eller fluorogent substrat som igjen vil gi et signal.

ELISA kan gjøres kvantitativt og kvalitativt. Ved kvantitativ ELISA vil den optiske tettheten eller fluorescerende enheter i prøven relateres til en standardkurve som typisk vil være en serie fortynninger av målmolekylet.

Analysetrinnene er som følgende:

- Antistoff spesifikt for antigenet adsorberes til fast fase, ofte brønn i en mikrotiterplate.
- Blokkering.
- Prøve settes på.
- Deteksjonsantistoff, spesifikt for antigenet, tilsettes sammen med prøve i en bestemt mengde.
- Enzym tilsettes.
- Substrat tilsettes, dette omdannes ved hjelp av enzymet til å gi et kromogent eller fluorescerende signal.
- Avlesning ved hjelp av et optisk instrument.

Mellom trinnene vaskes platen for å fjerne overskudd av antistoffer og antigener.



Figur 9. Prinsipper for “sandwich”- ELISA (Modifisert figur fra internet (Active Motif 2006))

Prosedyre

Mediet fra cellekulturene ble overført til eppendorfrør og sentrifugert ved 250 xg i 10 min for å fjerne celler, deretter ved 2500 xg for å fjerne resterende partikler. Supernatanten ble overført til eppendorfrør. Bestemmelse av cytokin-nivå ble gjort umiddelbart etter høsting, eller på prøver som hadde vært frosset ned ved -70°C .

For kvantifisering av humant IL-8 ble det brukt et ”kit” fra Biosource International. ”Kitets” sensitivitet var $<5\text{ pg/ml}$ og det kunne detektere innenfor et område fra 15,6-1000 pg/ml. Prøver og standarder ble fortynnet til å ligge innenfor dette området. Etter påsetting av prøver og standard på et 96-brønners brett, som var ”coatet” med spesifikt antistoff, ble deteksjonsantistoff tilsatt og dette ble inkubert i 2 timer. Deretter ble platen vasket og ”horse raddish peroxidase” (HRP) tilsatt. Det ble inkubert på nytt i en halv time før tetrametylbenzidin ble tilsatt, og resultatet kunne leses av ved hjelp av UV-lys med $\lambda=450\text{ nm}$ etter at reaksjonen mellom enzym og substrat hadde blitt stoppet. Deteksjon av IL-1 β ble utført på samme måte som deteksjon av IL-8. Konsentrasjonen på standarden for IL-1 β lå mellom 0 og 250 pg/ml.

Metode og løsninger brukt til bestemmelse av IL-8 nivå var i samsvar med fabrikantens retningslinjer. Disse fulgte med ”kitet” som ble brukt; Cytokine ELISA assay for humane IL-8, Biosource International, Camarillo, CA, USA. Bestemmelse av IL-1 β ble utført ved bruk av ”kitet” Duoset ELISA Development system for humane IL-1 β , R&D Systems Europe Ltd, Minneapolis, USA.

1.10.6 Elektroforese og Western immunoblotting

Western blotting er en teknikk som innebærer at proteiner, etter å ha blitt separert ved elektroforese, blir overført og immobilisert på en polymer membran for deretter å kunne detekteres ved bruk av immunologiske teknikker.

Måling av proteinmengde

Før Western blotting ble proteinmengden i celleprøvene målt. Dette ble gjort med ”Bio-Rad DC Protein Assay”. Metoden baseres på en reaksjon mellom protein og en alkalisk kobberløsning. Reaksjonen er en reduksjon av folin med kobber-proteinkomplekset. Komplekset får da en karakteristisk blå farge som gjør at man kan kvantifisere proteinene ved UV-lys.

Prosedyre

Kulturene ble holdt på is for å hemme proteaseaktivitet ved høsting. Buffere som ble brukt til høsting av cellene var kalde og tilsatt proteasehemmer (fenylmetylsulfonylfluorid; PMSF). Etter å ha vasket cellene et par ganger med PBS ble de tilsatt PBS med PMSF og skrapet av skålene. Skålene ble etterskylt med PBS med PMSF, overført til Falconrør og sentrifugert ved 250 xg i 10 min. Pelleten ble vasket og sentrifugert to ganger, deretter tilsatt 1x lysisbuffer og sonikert for å kutte DNA-trådene og dermed gjøre løsningen mindre viskøs. Etter sentrifugering ved 2500 xg ble supernatanten suget av og frosset ned.

Proteinmengden i prøvene ble målt før bruk. Standard og prøver ble fortynnet i destillert vann. Fortynnet prøve og standard ble pipettert ut på en mikrotiterplate. Deretter ble hver brønn tilsatt reagens A' (1 ml reagens A tilsatt 20 µl reagens S) og reagens B. Alle reagensene var fra "kitet". Etter inkubering ble absorbansen lest av ved 630 nm. Proteinkonsentrasjonen i prøvene ble lest av fra standardkurven. Hver prøve ble fortynnet til en passende konsentrasjon. Dette ble gjort ved å justere med 1x lysisbuffer (62,5 mM Tris buffer 6,8 %, 2 % SDS, 5 % glyserol, 1 mM natrium orthovandat, 5 mM EDTA, 20 mM NaF, 1 mM PMSF, 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin og 10 µg/ml pepstatin) til alle prøvene hadde lik konsentrasjon. Så ble 5xSDS-PAGE sample buffer (0,312 M Tris-HCl, pH 6,8 10 % SDS, 25 % β-merkapt ethanol, 0,05% bromfenolblått) og glyserol tilsatt. Prøvene ble deretter kokt i 2 min.

SDS-polyakrylamid gelelektroforese

Elektroforese er en separasjonsteknikk der ioniske eller ioniserbare forbindelser blir separert på basis av at de har forskjellig mobilitet i et elektrisk felt. Proteinene i prøven vil dissosiere i individuelle polypeptider ved oppvarming med overskudd av natriumdodecylsulfat (SDS) og thiolreagens tilstede. SDS bindes til polypeptidene i et konstant vektforhold slik at SDS-polypeptid-kompleksene har tilnærmet lik ladningstetthet. Kompleksene vil dermed separeres etter molekylstørrelse ved SDS-polyakrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE)

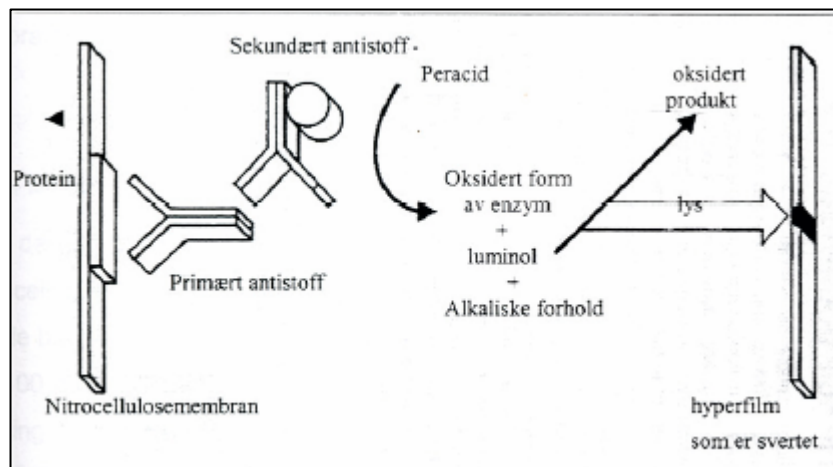
Prøvene appliseres i brønner på en samlegel. Denne gelen konsentrerer prøvene i smale bånd før de går over i separasjonsgelen. Samlegel og separasjonsgel har ulik tetthet, pH og ionestyrke. Når proteinene går over i separasjonsgelen vil de retarderes fordi separasjonsgelen har mindre porer enn samlegelen. Polyakrylamidgeler lages ved polymerisering av akrylamidmonomere til lange kjeder og kryssbinding av disse med N, N'-metylenbisakrylamid. Polymeriseringen katalyseres av ammoniumpersulfat og N, N, N', N'-tetrametylendiamin (TEMED). TEMED katalyserer dannelsen av frie radikaler fra persulfat som initierer polymeriseringen. Effektiv porestørrelse bestemmes av total akrylamidkonsentrasjon.

Prosedyre

Akrylamidkonsentrasjon (8-10 %) for separasjonsgelen ble valgt ut fra molekylvekten til proteinene som skulle detekteres. Denne gelen ble støpt mellom glassplatene. Etter at separasjonsgelen hadde stivnet kunne samlegelen støpes over separasjonsgelen. Det ble satt på 12,5 µg protein i hver brønn. I en av brønnene ble det tilsatt en molekylvektsmarkør. Gelene ble kjørt ved 200 V til frontmarkøren i prøvebufferen (bromfenolblått) hadde vandret ut av gelen.

Proteinblotting og immunodeteksjon

Etter separasjonen av proteinene overføres og immobiliseres de på en nitrocellulosemembran. Dette skjer ved elektroblotting. Proteinene er negativt ladet og i et elektrisk felt vil de bevege seg mot den delen av feltet som er positivt ladet. Nitrocellulosemembranen plasseres ved positiv pol og fanger opp proteinene i vandring. Proteinene på blottet identifiseres ved hjelp av spesifikke antistoffer som ble visualisert med et peroksidasekoblet sekundært antistoff. Detektering skjer ved hjelp av luminesens. Peroksydasen reagerer med et substrat og avgir lys som et biprodukt i reaksjonen. Lyset detekteres på film.



Figur 10 . Prinsipper for Western analyse og deteksjon.

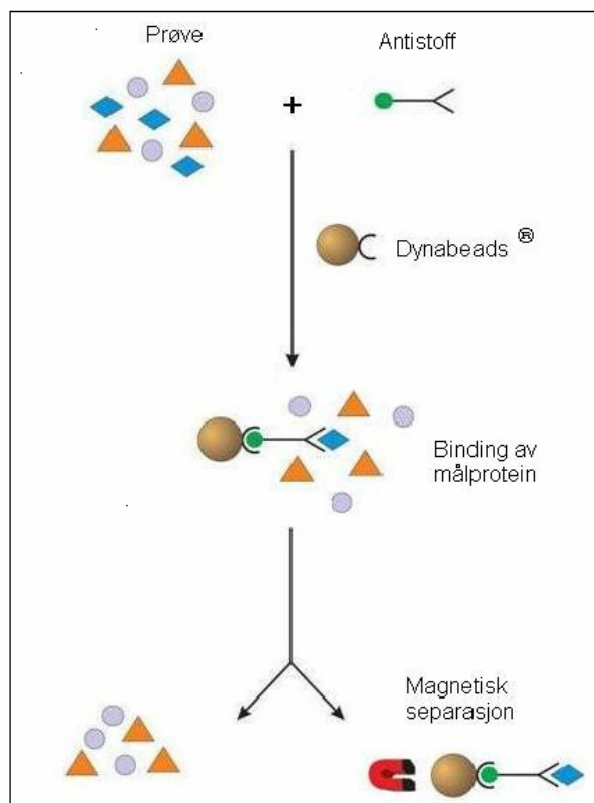
Prosedyre

Etter SDS-PAGE ble proteinene overført elektroforetisk til en nitrocellulosemembran ved 70 V i i 1 time ved romtemperatur. Blottet ble farget med Ponceau S fargeløsning for å undersøke om påsettingen av protein på gelen og blottingen var jevn. Nitrocellulosefilteret ble blokkert med 3 % fettfri tørrmelk i trisbufret saltvann med tween. Primært antistoff mot fosforylert ERK1/2, p38 og JNK ble fortynnet i tørrmelk eller BSA, avhengig av produsentens anbefalinger og tilsatt de ulike membranene. Deretter ble blottet inkubert over natt ved 4 °C eller 2 timer i romtemperatur. Etter dette ble membranen inkubert med peroksidase-konjugert antistoff mot det primære antistoffet, fortynnet 1:2000 for anti-mus og 1:10 000 for anti-kanin. Substratet Supersignal West Dura Extended Duration ble brukt som anbefalt av leverandøren, og lyset detektert på film.

For deteksjon av total mengde av de ulike enzymene (ERK1/2, p38 og JNK1/2) og β -aktin, ble blottene strippet for bundet antistoff. Dette ble gjort ved å inkubere blottene i Restore Western Blot Stripping Buffer i ca 15 min ved romtemperatur. Etter vasking av membranene ble de behandlet som over, bortsett fra at de primære antistoffene var mot den totale mengden av de ulike MAP-kinasene.

1.10.7 Immunopresipitering av epidermal vekstfaktor-reseptor (EGFR)

Ved immunopresipitering brukes en teknikk der et antigen felles ut av en løsning ved å bruke et antistoff som er spesifikt for dette antigenet. Dette kan brukes til å identifisere proteinkomplekser som er til stede i celleekstrakter. Spesifikke antistoffer vil kunne binde seg til spesifikke antigener i prøvene. På denne måten henter man ut hele komplekset og analyserer videre for å identifisere proteinene ved hjelp av for eksempel Western blotting.



Figur 11. Prinsipper for immunopresipitering (Modifisert figur fra internet;(Invitrogen 2006))

Prosedyre

Ved høsting ble cellekulturene holdt på is for å hemme proteaseaktivitet. Først ble cellene vasket 2 ganger med PBS, deretter en gang med immunopresipiteringsbuffer (50 mM Tris-buffer (pH 7,4), 280 mM NaCl, 0,2 mM EDTA, 50 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 2 mM EGTA, 1 mM aktivert Na_3VO_4 , 1 mM PMSF, 10 % glyserol, destillert vann ad 50 ml, 1 tablett Complete protease inhibitor). Cellene ble deretter lysert ved hjelp av immunopresipiteringsbuffer tilsatt 1 % Nonidet P-40. Etter 15 min ble uløselig materiale fjernet ved å sentrifugere lysatet ved 250 xg i 10 min. Supernatanten ble inkubert med 1 μg antistoff for EGFR ved 4 °C over natt. Immunopresipitatet ble fanget opp ved å tilsette dynalkuler og inkubere over natt (Figur 11). Immunopresipitatet ble

løst fra dynalkulene ved å koke det i 5 min med 2x Laemmli buffer. Deretter ble immunopresipitatet kjørt på en SDS-PAGE gel, blottet over på en membran og fosforylert EGFR ble detektert ved å bruke antistoff for fosfo-tyrosin (1:2000), sekundært HRP-konjugert antistoff (anti-mus 1:2000), og Supersignal West Dura Extended Duration.

1.10.8 Statistikk

Resultatene ble analysert ved hjelp av statistikkprogrammet SigmaStat. Det ble valgt student's t-test som testmetode for å sammenligne om forskjellene var sigifikante. P-verdi mindre enn 0,05 ble betraktet som signifikante.

RESULTATER

1.11 Etablering av dyrknings- og eksponeringsbetingelser

I innledende forsøk ble ulike betingelser for eksponering av A549-celler med sveiserøykpartikler undersøkt. Når serum er tilstede i mediet kan dette påvirke partiklenes toksisitet (Okeson et al., 2004). Partikkeloverflaten kan dekket (coated) av proteiner i serum, og proteinene kan binde partiklenes løselige komponenter. Vi undersøkte derfor først om proteiner i serum kunne påvirke A549-cellenes respons på sveiserøykpartikler. Cellene ble enten eksponert med 10 % føtalt kalveserum (FKS) tilstede under hele eksponeringen eller 10 % FKS tilsatt 4 timer etter eksponeringsstart. Ved å vente med tilsetning av FKS til etter eksponeringsstart er det teoretisk sett redusert sannsynlighet for at proteiner bindes til partikkeloverflaten og på den måten hindrer kontakt mellom celler og partikler. Albumin i serum har en viktig funksjon som transportmolekyl for små molekyler, og har også stor affinitet for metaller. For å vurdere albumins effekt i forhold til serum i vårt cellekultursystem, ble bovint serum-albumin (BSA) også prøvet ut. Fordelen med BSA i kulturene sammenlignet med FKS er at betingelsene blir mer definerte.

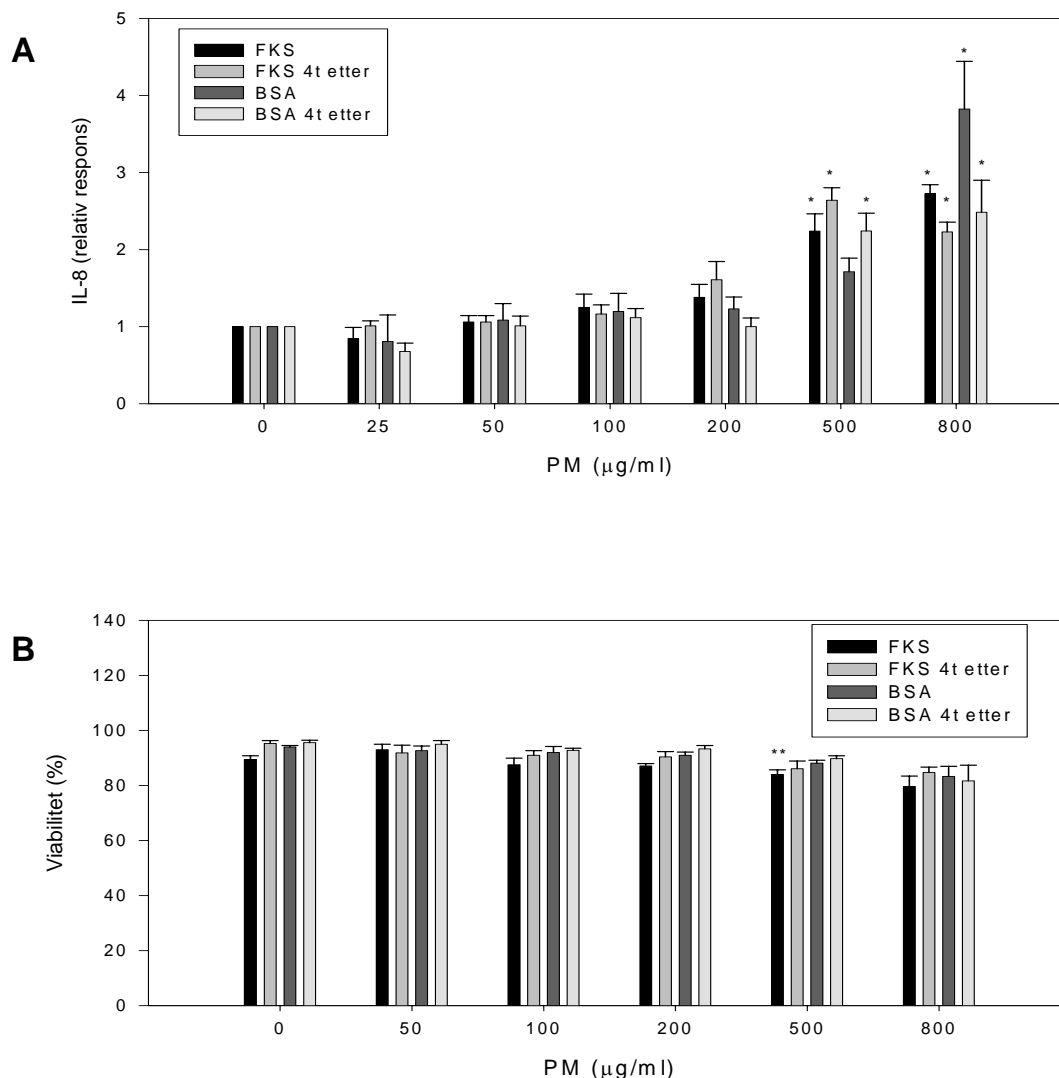
1.11.1 Effekt av serum og albumin i kulturene ved eksponering for sveiserøykpartikler

Betydningen av FKS og BSA i mediet for sveiserøykpartiklenes evne til å forårsake utskillelse av cytokinet IL-8 fra A549-celler ble undersøkt. Cellekulturene ble da eksponert for økende konsentrasjoner av partikler i suspensjon (0-800 µg/ml) i 20 timer. Figur 12A og Tabell 2 viser utskillelsen av IL-8 i kulturer med 10 % FKS eller 0,1 % BSA tilsatt dyrkningsmediet ved eksponeringsstart. Alternativt ble FKS eller BSA tilsatt 4 timer etter eksponeringsstart. Cellekulturene ble dyrket i serumfritt medium i 20 timer før eksponeringsstart. Kulturene tilsatt FKS ga høyere nivåer av IL-8 enn kulturer med BSA, dette gjaldt både basalt (Tabell 2) og i eksponerte cellekulturer. I Figur 12A er imidlertid IL-8-responsen overfor partikler angitt relativt til den basale frigjøringen under de ulike dyrkningsbetingelsene. Resultatene ble ikke sammenlignet med kulturer uten tilsetning av FKS eller BSA. Ved 500 µg/ml og PM var det en signifikant økning i IL-8-frigjøringen i alle kulturer, bortsett fra den med BSA i mediet under hele eksponeringen. Ved 800 µg/ml var det en signifikant økning i alle kulturene. Det var ingen signifikante forskjeller mellom de ulike dyrkningsbetingelsene.

Tabell 2: IL-8-frigjøring i A549-celler etter å ha tilsatt 10 % FKS eller 0,1 % BSA ved forsøkets start eller 4 t senere.

Tilsetning	IL-8-nivå ± SE (pg/ml)
FKS	1344 ± 177
FKS 4 timer etter	1423 ± 228
BSA	614* ± 123
BSA 4 timer etter	644* ± 99

* Signifikant lavere enn FKS tilsatt på tilsvarende tidspunkt.



Figur 12. Effekt av FKS og BSA på frigjøring av IL-8 og viabilitet i A549-cellekulturer eksponert med sveiserøykpartikler. A549-celler ble eksponert med økende konsentrasjon av partikler (PM) og inkubert i 20 timer. Konsentrasjonen av PM er oppgitt som masse per volum medium i brønn. **A:** Effekt av PM på IL-8-frigjøring etter å ha tilsatt 10 % FKS eller 0,1 % BSA samtidig som mediet ble skiftet (20 timer før eksponering) eller 4 timer etter eksponeringsstart. Responsen er angitt relativt til basal IL-8-utskillelse. **B:** Viabilitet av A549-celler ved samme eksponeringsmønster. IL-8 og viabilitet ble målt som beskrevet under "Materiale og metoder". Resultatene er gitt som gjennomsnitt ± SE(n≥6). * Signifikant økning sammenlignet med kontroll. ** Signifikant lavere enn BSA tilsatt 4 timer etter eksponeringsstart ved samme PM-konsentrasjon (p<0,05).

Viabiliteten i de forskjellige cellekulturene ble undersøkt i et fluorescensmikroskop etter farging med propidiumjodid (PI) og Hoechst 33342. Andelen apoptotiske celler var så lav at denne ikke ble kvantitert. PI-positive celler ble definert som ikke-viable, og PI-negative celler som viable. Viabiliteten ble angitt som % levende celler av totalt celletall.

Sveiserøykpartiklene ga ingen signifikant nedgang i viable celler selv ved de høyeste partikkelkonsentrasjonene. Det var heller ingen forskjeller i viabilitet mellom cellekulturene ved de ulike dyrkningsbetingelsene (Figur 12B), bortsett fra at kulturer som var eksponert med FKS hele tiden ved en partikkelkonsentrasjon på 500 µg/ml viste lavere viabilitet enn kulturer som var eksponert med BSA tilsatt 4 timer etter eksponeringsstart. Resultatene tyder på at sveiserøykpartiklene ikke ga endringer i cytotoxissitet som kunne påvirke utskillelsen av IL-8.

1.11.2 Uttesting av ulike BSA-konsentrasjoner

De videre forsøkene for måling av IL-8 responsen ble utført uten FKS tilsatt til cellekulturene. Derimot ble BSA videre uttestet ved tilsetning i ulike konsentrasjoner, enten ved eksponeringsstart, eller 4 timer etter.

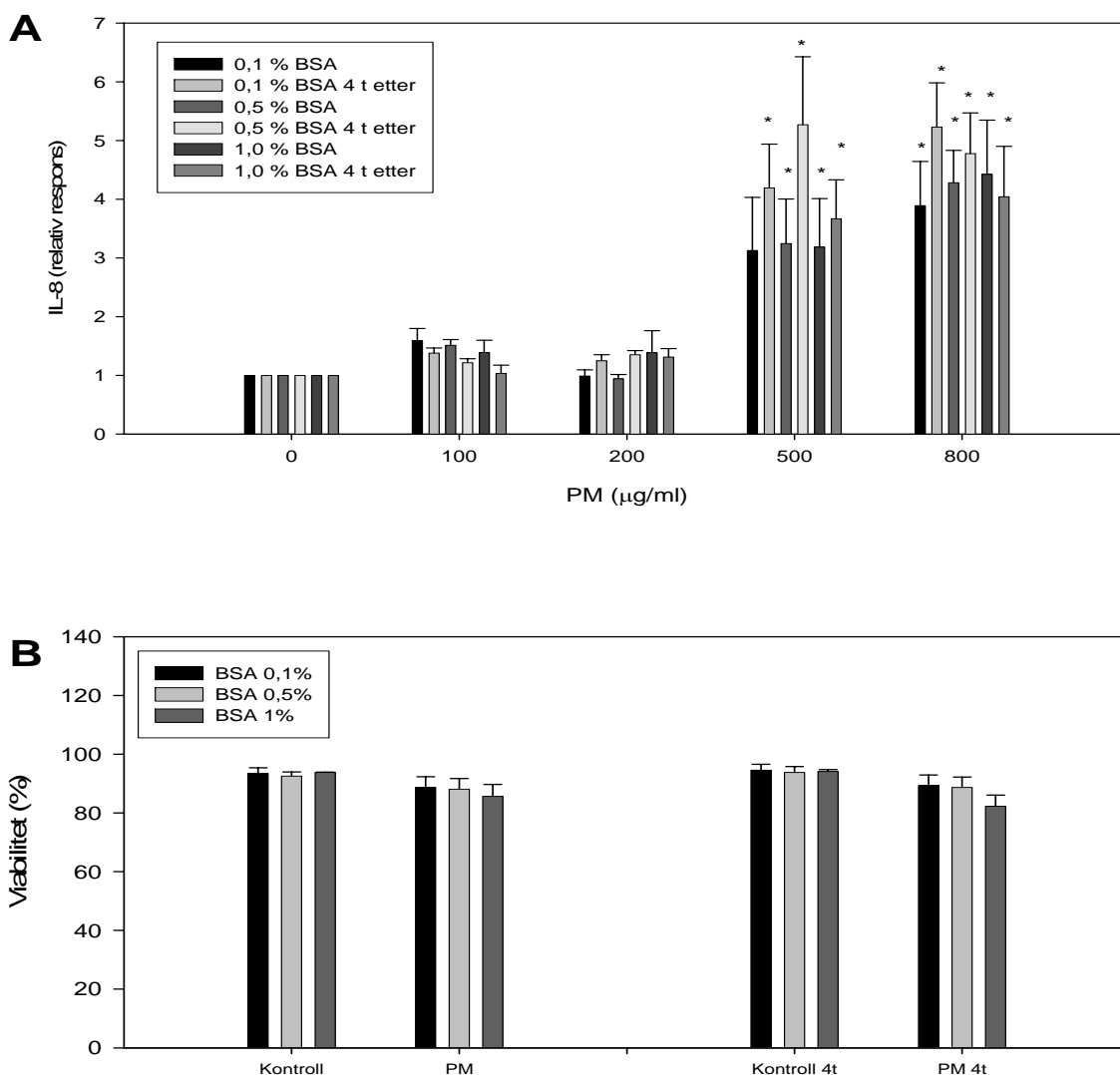
Figur 13A viser den relative IL-8-responsen på sveiserøykpartikler ved de ulike BSA-konsentrasjonene og tidspunktene for tilsetning. For de aller fleste kulturbetingelsene var det en signifikant økning i respons ved 500 µg/ml. Det var ingen signifikante forskjeller i den relative responsen på sveiserøykpartiklene ved forskjellige konsentrasjoner av BSA (se Figur 13A). Det var imidlertid en tendens til noe større respons når BSA ble tilsatt 4 timer etter eksponeringsstart.

Effekten av eksponering med partiklene på viabiliteten i A549-cellekulturene er illustrert i Figur 13B. Det ble ikke observert noen signifikante forskjeller i viabilitet i kulturene ved de ulike BSA-konsentrasjonene. Figur 14 viser et fluorescence-bilde av eksponerte og ikke-eksponerte A549-celler.

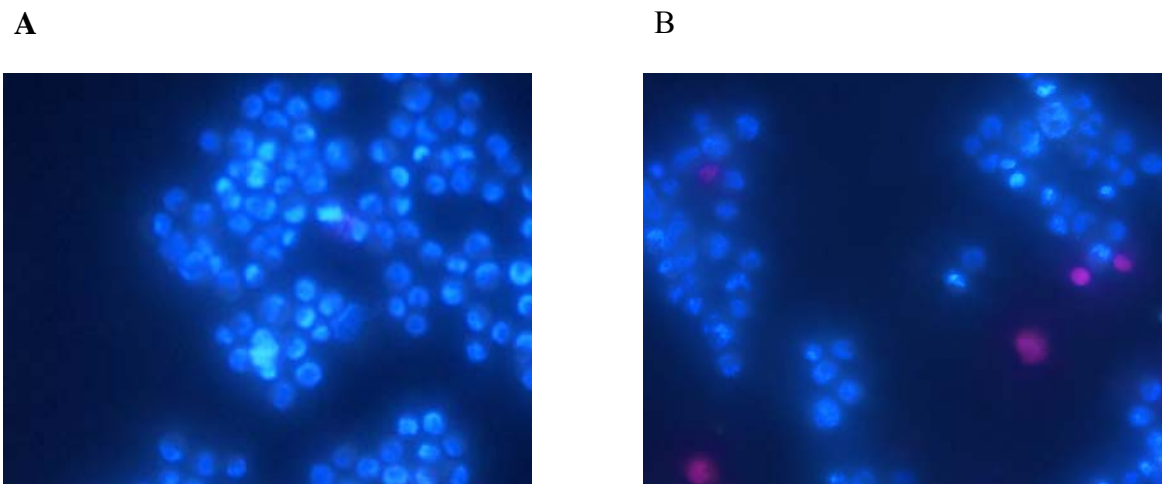
Tabell 3: IL-8-frigjøring i A549-celler etter å ha tilsatt 0,1, 0,5 eller 1 % BSA ved forsøkets start eller 4 t senere.

Tilsetning	IL-8-nivå ± SE (pg/ml)
0,1 % BSA	580 ± 69
0,1 % BSA 4 t etter	510 ± 67
0,5 % BSA	707 ± 69
0,5 % BSA 4 t etter	749 ± 94
1,0 % BSA	951* ± 128
1,0 % BSA 4 t etter	951* ± 136

* Signifikant i forhold til 0,1 % BSA tilsatt på tilsvarende tidspunkt



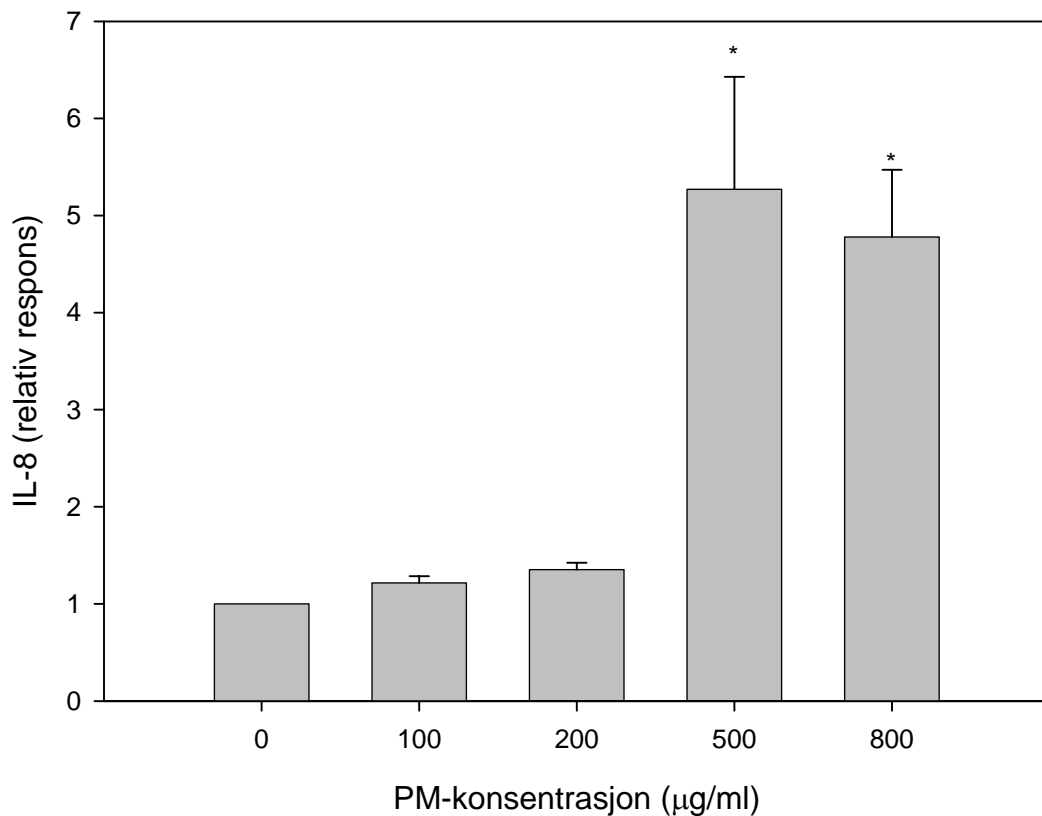
Figur 13. Effekt av ulike BSA-konsentrasjoner på frigjøring av IL-8 og viabilitet i A549-cellekulturer eksponert med sveiserøykpartikler. A549-cellene ble eksponert med økende konsentrasjon av partikler (PM) og inkubert i 20 timer. Konsentrasjonen av PM er oppgitt som masse per volum medium i brønn. **A:** Effekt av PM på frigjøring av IL-8 etter å ha tilsatt ulike konsentrasjoner av BSA samtidig som mediet ble skiftet (20 timer før eksponering) eller 4 timer etter eksponeringsstart. **B:** Viabilitet i hhv kontroller og eksponerte (500 µg/ml) kulturer hvor BSA har vært tilstede hele tiden (hhv Kontroll og PM), og hvor BSA ble tilsatt fire timer etter eksponering (hhv Kontroll 4t og PM 4t). Viabiliteten er angitt i % PI-negative celler av totalt celletall. IL-8 og viabilitet ble målt som beskrevet under "Materiale og metoder". Resultatene er gitt som gjennomsnitt ± SE (n≥5). * Signifikant økning i forhold til kontroll (p<0,05)



Figur 14. Effekt av PM på viabilitet. Figuren viser ikke-eksponerte celler (**A**), og celler som har blitt eksponert med 500 µg/ml PM-suspensjon (**B**). Hoechst-positive (blå) celler er viable, mens PI-positive celler (røde) er døde celler. BSA ble tilsatt til en konsentrasjon på 0,5 % 4 timer etter eksponering. Bildet er tatt ved 400x forstørrelse i et fluorescensmikroskop.

1.11.3 Frigjøring av IL-8 ved etablerte kulturbetingelser

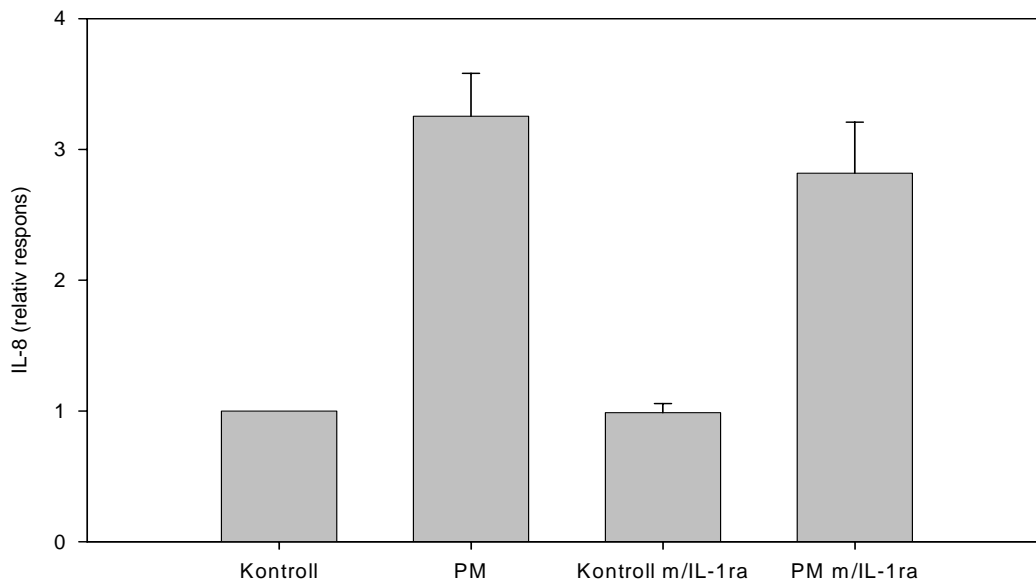
I de videre forsøkene ble det valgt å bruke 0,5 % BSA i stedet for FKS, med tilsetning 4 timer etter eksponeringsstart. Eksponering ved disse betingelsene og økende konsentrasjon av sveiserøykpartikler er vist i Figur 15. Den viser en økt IL-8-frigjøring fra A549-cellekulturene med økende partikkelkonsentrasjon. Responsen var signifikant økt for kulturer eksponert med de to høyeste konsentrasjonene av partikler.



Figur 15. IL-8-respons i A549-cellekulturer eksponert med sveiserøykpartikler. A549-celler ble eksponert med økende konsentrasjon av partikler (PM) og inkubert i 20 timer. BSA (0,5 %) ble tilsatt 4 timer etter eksponeringsstart for partikler. Konsentrasjonen av PM er oppgitt som masse per volum medium i brønn. Resultatene er angitt som relativ respons i forhold til ikke-eksponerte kulturer (kontroll= 749 ± 94 pg/ml IL-8). IL-8 ble målt som beskrevet under ”Materiale og metoder”. Resultatene er gitt som gjennomsnitt \pm SE ($n \geq 4$). * Signifikant økning i forhold til kontroll ($p < 0,05$).

1.12 Regulering av IL-8-frigjøring

I flere celletyper er det vist at oppregulering av IL-8-responsen helt eller delvis styres av det proinflammatoriske cytokinet IL-1 β (Ahmad et al., 2003; Ishii et al., 2004). For å undersøke om reguleringen av IL-8 responsen ble påvirket av IL-1 β i vårt cellekultursystem, ble reseptoren for IL-1 α -og β blokkert ved hjelp av en antagonist (IL-1ra), Anakinra. Resultatene viste ingen signifikant redusert IL-8-respons i cellekulturer med antagonisten tilstede (Figur 16). Ved måling av IL-1 β ble det heller ikke detektert frigjøring fra kulturene ved de konsentrasjonene av sveiserøykpartikler som ble brukt (data ikke vist). Disse siste forsøkene ble imidlertid bare utført med 20 timers eksponering, og utelukker ikke en frigjøring av IL-1 β på et tidligere tidspunkt.

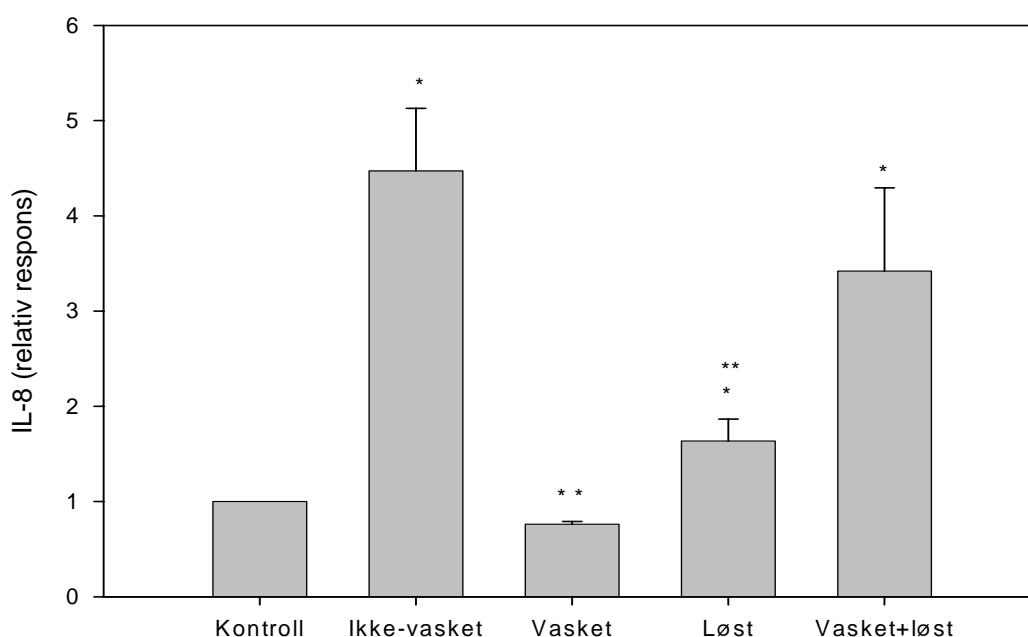


Figur 16. Effekt av IL-1-reseptor-antagonist på frigjøring av IL-8 i A549-cellekulturer eksponert med sveiserøykpartikler. A549-celler ble tilsatt IL-1ra i overskudd 30 min før eksponering med 500 $\mu\text{g/ml}$ partikler (PM), deretter ble cellene inkubert i 20 timer. IL-8 ble målt som beskrevet under "Materiale og metoder". Responsen er angitt relativt til basalresponsen i fravær av antagonist (kontroll= 1055 ± 216 pg/ml IL-8). Resultatene er gitt som gjennomsnitt \pm SE (n=5).

1.13 Partikkelegenskaper og evnen til å indusere IL-8-respons

1.13.1 Løselig/vasket fraksjon av partikler

For å undersøke hvilke partikkelkomponenter som er av betydning for IL-8-responsen observert etter eksponering med sveiserøykpartikler, ble partikkelsuspensjonen inndelt i vasket og løselig fraksjon. Etter å ha behandlet partiklene som beskrevet under "Materiale og metoder", ble de ulike partikkelfraksjonene tilsatt cellekulturene (Figur 17). Den vaskede fraksjonen av partikkelsuspensjonen, som inneholder partikkelkjerner/uløselige komponenter, ga ingen stimulering av IL-8-frigjøring. Den løselige fraksjonen ga en respons som var ca 60 % høyere enn basalresponsen, men betydelig lavere enn ikke-vasket partikkelsuspensjon. Da cellekulturene ble eksponert for kombinasjonen av vaskede partikler og løselige komponenter kom responsen igjen opp mot IL-8 nivået observert etter eksponering med ikke-vaskede, ubehandlede partikler.

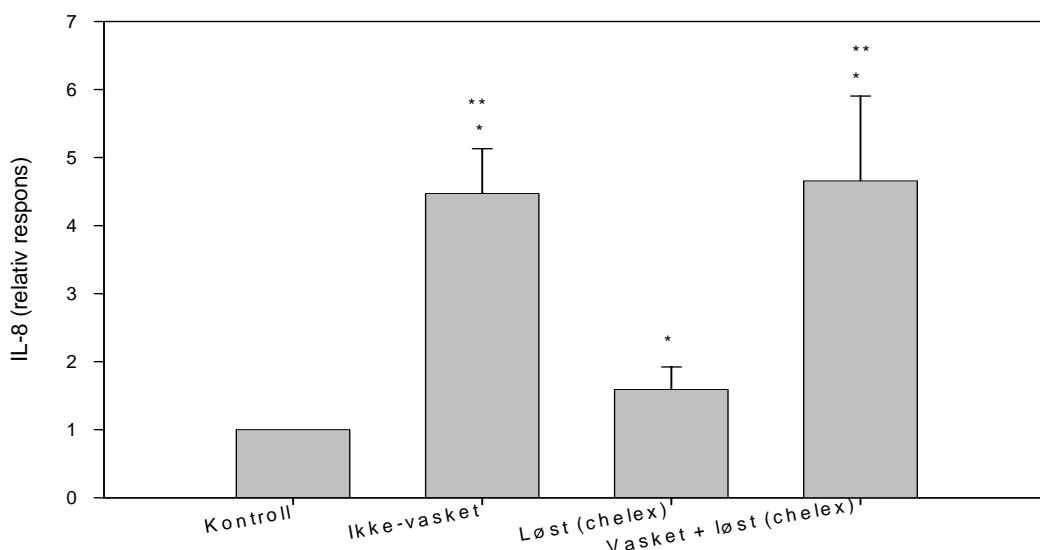


Figur 17. IL-8-respons i A549-celler eksponert for ulike fraksjoner av sveiserøykpartikler. A549-cellekulturer ble eksponert for ikke-vaskede partikler, vasket og løselig fraksjon og kombinasjonen av de to siste i 20 timer. IL-8 ble målt som beskrevet under "Materiale og metoder". Responsen er angitt relativt til ikke-eksponerte kulturer (kontroll= 939 ± 92 pg/ml IL-8). Resultatene er gitt som gjennomsnitt \pm SE (n=8). *Signifikant økning i forhold til kontroll, ** signifikant reduksjon i forhold til ikke-vasket partikkel ($p < 0,05$).

1.13.2 Metaller i løselig fraksjon

For å avgjøre om metaller bidrar til responsen på sveiserøykpartikler i A549-cellekulturene, ble det forsøkt å fjerne metallene fra partikkelsuspensjonen. Til dette ble det brukt en chelator, chelex, som binder kationer, inkludert overgangsmetaller (McNeilly et al., 2005; Molinelli et al., 2002). Partikkelsuspensjonen ble behandlet som beskrevet under ”Materiale og metoder”. Chelex-behandlet partikkelsuspensjon ble tilsatt cellekulturene etter sentrifugering på samme måte som den løselige fraksjonen som ikke ble behandlet med chelex. Fordi partikkelkjernene ikke kunne skilles fra chelex-kulene, kunne ikke cellekulturene eksponeres med vaskede partikler behandlet med chelex. Derimot ble den vaskede fraksjonen som ikke var behandlet med chelex benyttet i kombinasjon med løselig fraksjon behandlet med chelex.

Chelex-behandlet løselig fraksjon ga en liten, men statistisk signifikant, økning i IL-8-nivå i forhold til kontrollen (Figur 18). Dette var omtrent som responsen ved eksponering med ikke-chelexbehandlet løselig partikkelfraksjon vist i Figur 17. Kombinasjonen av løselig, chelex-behandlet fraksjon og vasket, ubehandlet fraksjon ga en tilsvarende respons som ikke-vaskede, ubehandlede partikler. Resultatene tyder på at det ikke er chelaterbare metaller i den løselige fraksjonen som er ansvarlig for den observerte IL-8-responsen.



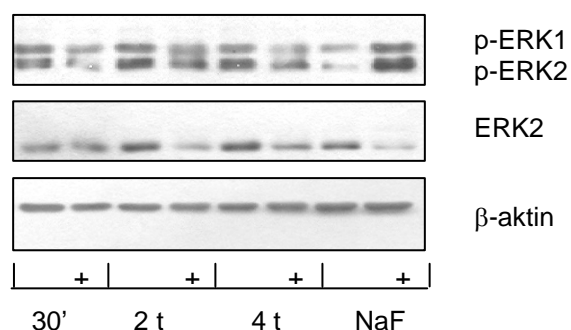
Figur 18. IL-8-respons i A549-cellekulturer eksponert med chelex-behandlede sveiserøykpartikler. A549-cellekulturer ble eksponert i 20 timer med ikke-vaskede, ubehandlede partikler, chelex-behandlet løselig fraksjon og kombinasjonen av chelex-behandlet løselig fraksjon og vaskede partikler. Responsen er angitt relativt til ikke-eksponerte kulturer (kontroll= 939 ± 92 pg/ml IL-8). IL-8 ble målt som beskrevet under ”Materiale og metoder”. Resultatene er gitt som gjennomsnitt \pm SE (n=4). * Signifikant økning i forhold til kontroll, ** signifikant økning i forhold til løselig fraksjon behandlet med chelex ($p < 0,05$).

1.14 Signalveier involvert i IL-8-respons etter eksponering for sveiserøykpartikler

Aktivering av MAP-kinaser spiller en viktig rolle i inflammatoriske responser i cellen (Hommes et al., 2003). Det ble derfor undersøkt i hvilken grad eksponering for sveiserøykpartikler i A549-celler kunne gi fosforylering av MAP-kinasene ERK, p38 og JNK registrert ved Western blotting. Videre ble det studert om disse forskjellige MAP-kinasene var involvert i IL-8-frigjøring. Dette ble gjort ved å eksponere med spesifikke hemmere av aktiveringen av de ulike MAP-kinasene.

1.14.1 Betydning av ERK-aktivering

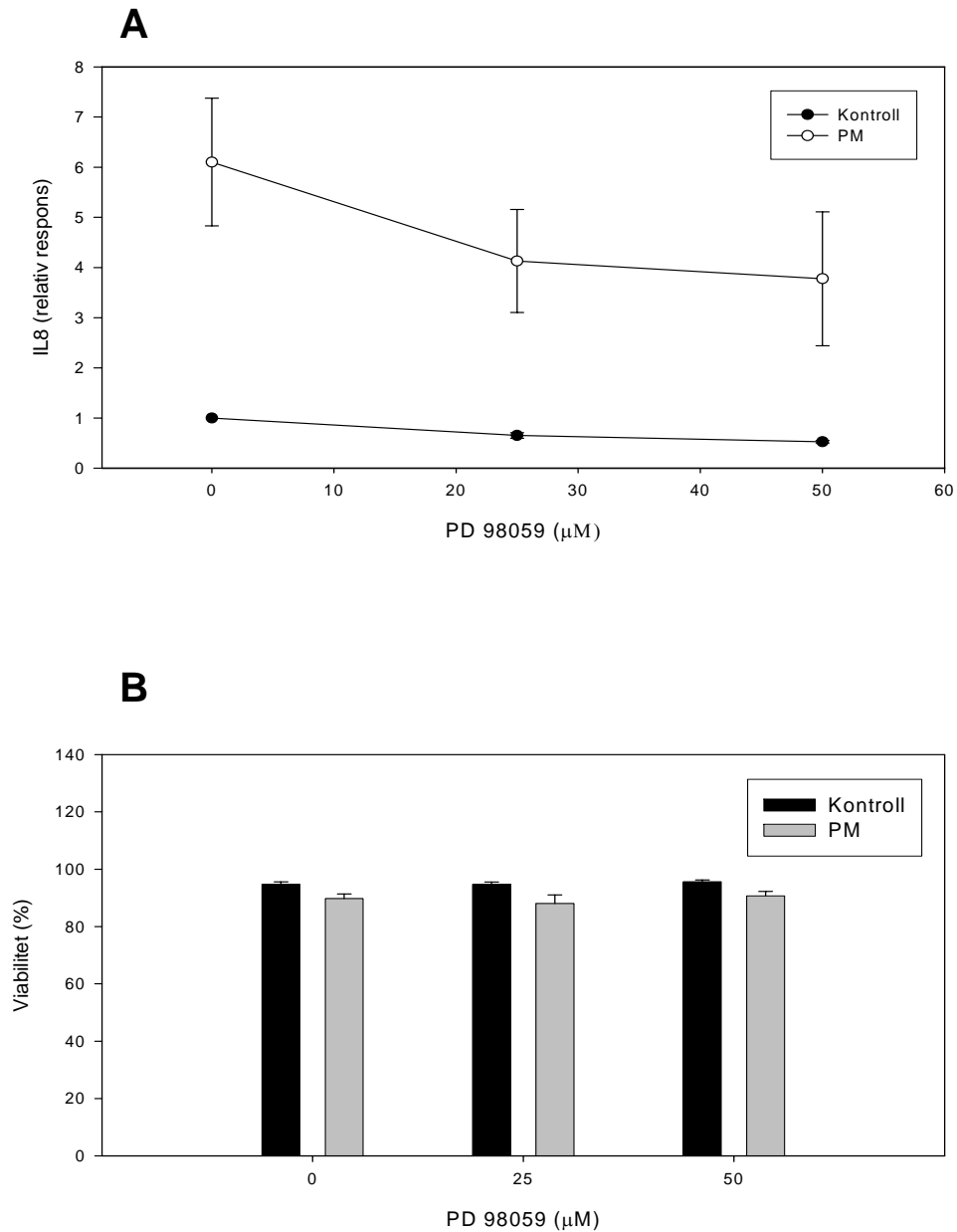
ERK-aktivering: Figur 19 viser Western blotting av fosforylert ERK1/2 (molekylvekt: hhv 44 og 42 kDa), total ERK2 og β -aktin. Cellene ble eksponert med sveiserøykpartikler i 30 min, 2 timer og 4 timer. Eksponering med 2,5 mM natriumfluorid (NaF) i 30 min er brukt som positiv kontroll. Det ble ikke observert økt fosforylering av ERK1/2 etter eksponering med sveiserøykpartikler på noe tidspunkt, mens NaF ga aktivering, som forventet (Refsnes et al., 2001).



Figur 19. Fosforylering av ERK i A549-cellekulturer etter eksponering for sveiserøykpartikler. A549-cellekulturer ble tilsatt 500 μ g/ml partikkelsuspensjon (+), og inkubert i 30 min, 2 timer eller 4 timer. NaF er brukt som positiv kontroll. Figuren viser fosforylert ERK1/2, total ERK2 og β -aktin. β -aktin er markør for total mengde påsatt protein. Deteksjon av proteinene ble foretatt ved Western blotting. Figuren viser et representativt blott (n=6).

Hemming av ERK-aktivitet: A549-cellekulturene ble forbehandlet i 30 min med en hemmer av ERK-signalveien, PD 98059, og deretter eksponert med sveiserøykpartiklene. Det ble observert et noe lavere nivå av IL-8 sammenlignet med kulturer eksponert uten hemmer. Reduksjonen var imidlertid ikke statistisk signifikant. Den basale IL-8-frigjøringen så også ut til å bli påvirket av PD 98059 (Figur 20A), men heller ikke denne reduksjonen var signifikant.

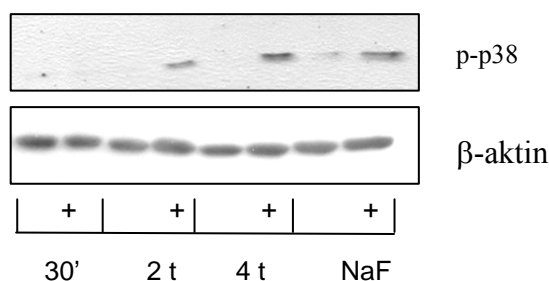
For å undersøke om hemmeren påvirket viabiliteten i cellekulturene ble PI-opptaket i cellene bestemt. Dette er vist i Figur 20B, hvor viabiliteten i partikkel-eksponerte kulturer synes litt lavere enn i kontrollene. Ingen av disse forskjellene var imidlertid statistisk signifikante, og synes ikke å være påvirket av PD 98059. Den ikke-signifikante reduksjonen av IL-8-nivået i cellekulturer eksponert for sveiserøykpartikler med hemmeren tilstede, sammenlignet med cellekulturer eksponert uten hemmer, kan dermed ikke forklares ved endringer i viabilitet.



Figur 20. Effekt av ERK-hemming på IL-8-frigjøring og viabilitet i A-549-celler. Cellekulturer ble eksponert med 500 $\mu\text{g/ml}$ partikkelsuspensjon (PM). PD ble tilsatt 30 min før eksponeringsstart i konsentrasjoner på 0, 25 og 50 μM . **A:** IL-8-respons i A549-cellekulturer eksponert med sveiserøykpartikler i fravær og nærvær av PD 98059. IL-8-responsen er angitt relativt til ikke-eksponerte kulturer (kontroll= 1148 ± 249 pg/ml IL-8). IL-8 ble målt som beskrevet under ”Materiale og metoder”. **B:** Viabilitet målt ved PI-opptak i eksponerte og ikke-eksponerte cellekulturer ved økende konsentrasjoner av hemmer. Resultatene er gitt som gjennomsnitt \pm SE (n=4).

1.14.2 Betydning av p38-aktivering

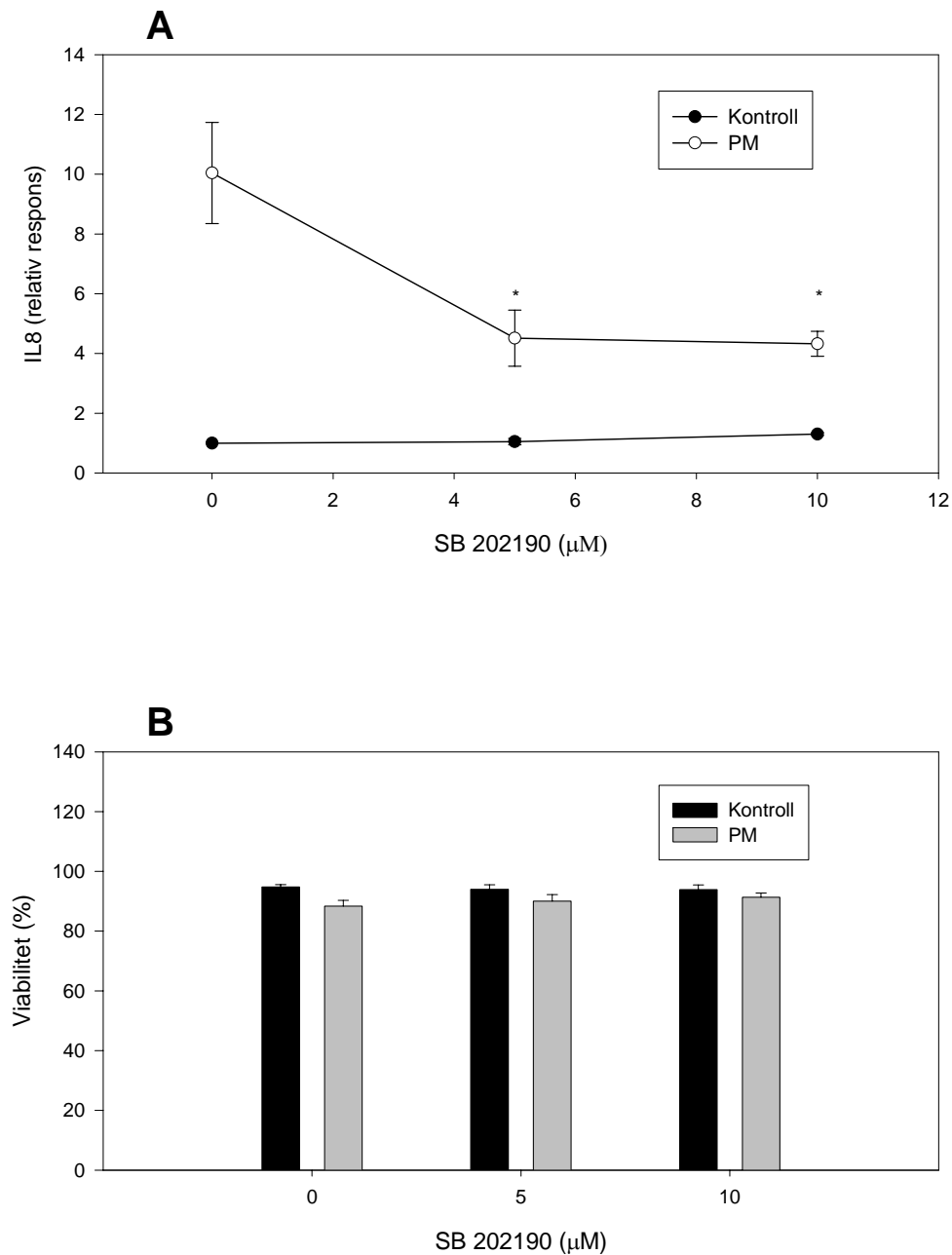
p38-aktivering: For å undersøke hvilken evne sveiserøykpartikler har til å fosforylere p38 (molekylvekt 38 kDa), ble cellekulturer eksponert i 30 min, 2 timer og 4 timer og analysert ved Western blotting. Eksponering med NaF i 30 min er brukt som positiv kontroll. Figur 21 viser at sveiserøykpartiklene ga fosforylering av p38 etter i 2 timer og 4 timer, mens ingen økt fosforylering ble påvist ved 30 min.



Figur 21. Fosforylering av p-38 i A549-cellekulturer etter eksponering for sveiserøykpartikler. A549-cellekulturer ble tilsatt 500 µg/ml partikkelsuspensjon (+) og inkubert i 30 min, 2 timer eller 4 timer. NaF er brukt som positiv kontroll. Figuren viser fosforylert p-38 og β-aktin. β-aktin er markør for total mengde påsatt protein. Deteksjon av proteinene ble foretatt ved Western blotting. Figuren viser et representativt blott (n=4).

Hemming av p38-aktivitet: Inhibitoren SB 202190 ble tilsatt cellekulturene for å avgjøre om aktivering av p38 ved partikkeleksponering har betydning for IL-8-frigjøring. Resultatet viste en signifikant reduksjon i IL-8-nivå ved både 5 og 10 µM hemmer tilstede (Figur 22A). IL-8-frigjøringen ble redusert med over 50 % i forhold til kulturer uten hemmer tilstede. Basalnivået av IL-8 var upåvirket.

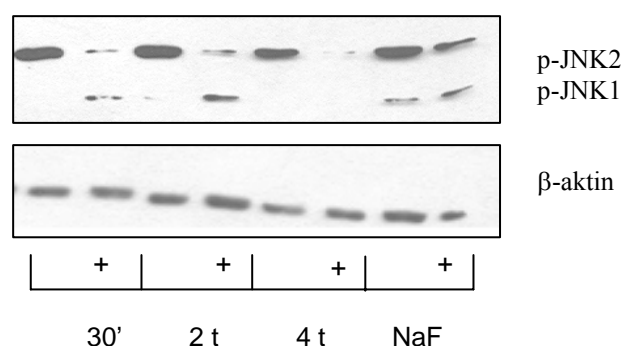
Viabiliteten i de ulike cellekulturene etter eksponering med og uten SB 202190 ble også bestemt (Figur 22B). Det ble observert noe høyere celledød i partikkeleksponerte kulturer enn i kontroll, men hemmeren synes ikke å påvirke viabiliteten. Ingen av disse effektene var signifikante, noe som tyder på at den reduserte IL-8-responsen ved bruk av p38-hemmeren ikke skyldtes redusert viabilitet.



Figur 22. Effekt av p-38-hemmer på IL-8-frigjøring og viabilitet i A549-celler. Cellekulturer ble eksponert med 500 µg/ml partikkelsuspensjon (PM). SB ble tilsatt 30 min før eksponeringsstart i konsentrasjoner på 0, 5 og 10 µM. **A:** IL-8-respons i A549-cellekulturer eksponert med sveiserøykpartikler og SB 202190. Responsen er angitt relativt til ikke-eksponerte kulturer (kontroll= 1109 ± 244 pg/ml IL-8). IL-8 ble målt som beskrevet under "Materiale og metoder". **B:** Viabilitet målt ved PI-opptak i eksponerte og ikke-eksponerte cellekulturer ved økende konsentrasjon av hemmer. Resultatene er gitt som gjennomsnitt ± SE (n=4). * Signifikant reduksjon i forhold til kulturer eksponert med sveiserøyk uten hemmer tilstede (p<0,05).

1.14.3 Betydning av JNK-aktivering

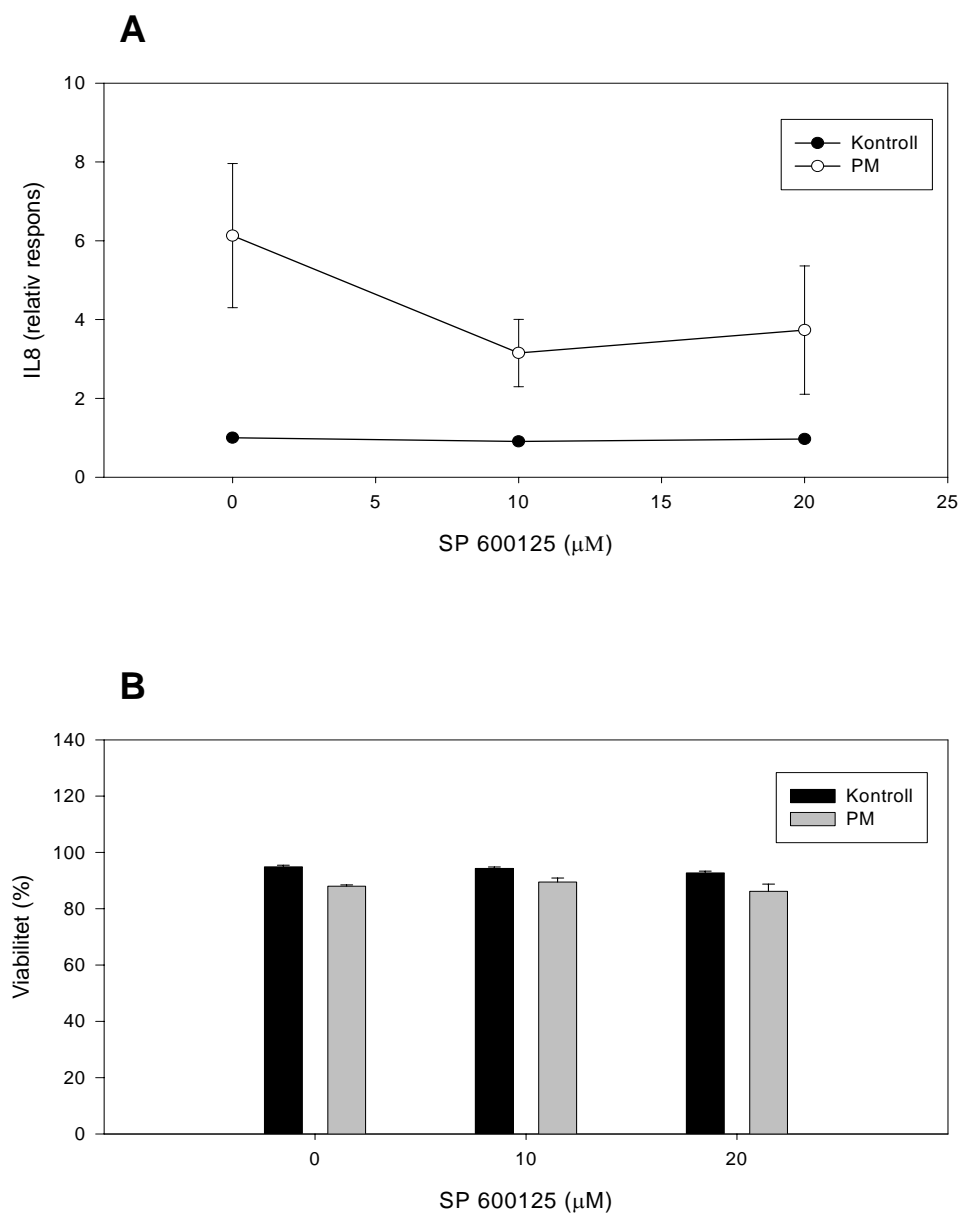
JNK-aktivering: Fosforyleringsgraden av JNK-1 og JNK-2 (molekylvekt: hhv 46 og 54 kDa) ble undersøkt ved Western blotting. Cellekulturene ble eksponert for sveiserøykpartikler i 30 min, 2 timer og 4 timer. Eksponering med 2,5 mM NaF i 30 min ble brukt som positiv kontroll. Forsøkene indikerer at JNK-2 defosforyleres ved partikkeleksponering, mens JNK-1 derimot, synes å bli fosforylert (Figur 23).



Figur 23. Fosforylering av JNK i A549-cellekulturer eksponert for sveiserøykpartikler. A549-cellekulturer ble tilsatt 500 µg/ml partikkelsuspensjon (+) og inkubert i 30 min, 2 timer eller 4 timer. NaF er brukt som positiv kontroll. Figuren viser fosforylert JNK-1 og JNK-2 og β-aktin. β-aktin er markør for total mengde påsatt protein. Deteksjon av proteinene ble foretatt ved Western blotting. Figuren viser et representativt blott (n=3).

Hemming av JNK-aktivitet: En JNK-inhibitor, SP 600125, ble brukt for å undersøke om JNK er involvert i IL-8-responsen etter eksponering med sveiserøykpartiklene. IL-8-responsen syntes å være delvis redusert i cellekulturer der konsentrasjonen av hemmeren i mediet var 10 µM, men denne reduksjonen var ikke signifikant (Figur 24A). Basalresponsene ble ikke påvirket av hemmeren.

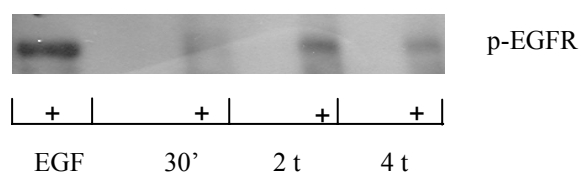
Også her ble det undersøkt om viabiliteten ble påvirket av hemmeren. Figur 24B viser at cellekulturer som hadde blitt eksponert for partikler viste en noe høyere dødelighet, men at SP 600125 ikke påvirket viabiliteten. Dette innebærer at det mulig reduserte IL-8-nivået ikke skyldtes redusert viabilitet.



Figur 24. Effekt av JNK-hemmer på IL-8-frigjøring og viabilitet i A549-celler. Cellekulturer ble eksponert med 500 μg/ml partikkelsuspensjon (PM). SP 600125 ble tilsatt 30 min før eksponeringsstart i konsentrasjoner på 0, 10 og 20 μM. **A:** IL-8-respons i A549-cellekulturer eksponert med sveiserøykpartikler og hemmer. Responsen er angitt relativt til ikke-eksponerte kulturer (kontroll= 864 ± 118 pg/ml IL-8). IL-8 ble målt som beskrevet under "Materiale og metoder". **B:** Viabilitet målt ved PI-opptak i eksponerte og ikke-eksponerte cellekulturer ved økende konsentrasjon av hemmer. Resultatene er gitt som gjennomsnitt ± SE (n=4).

1.14.4 Betydning av EGF-reseptor-aktivering

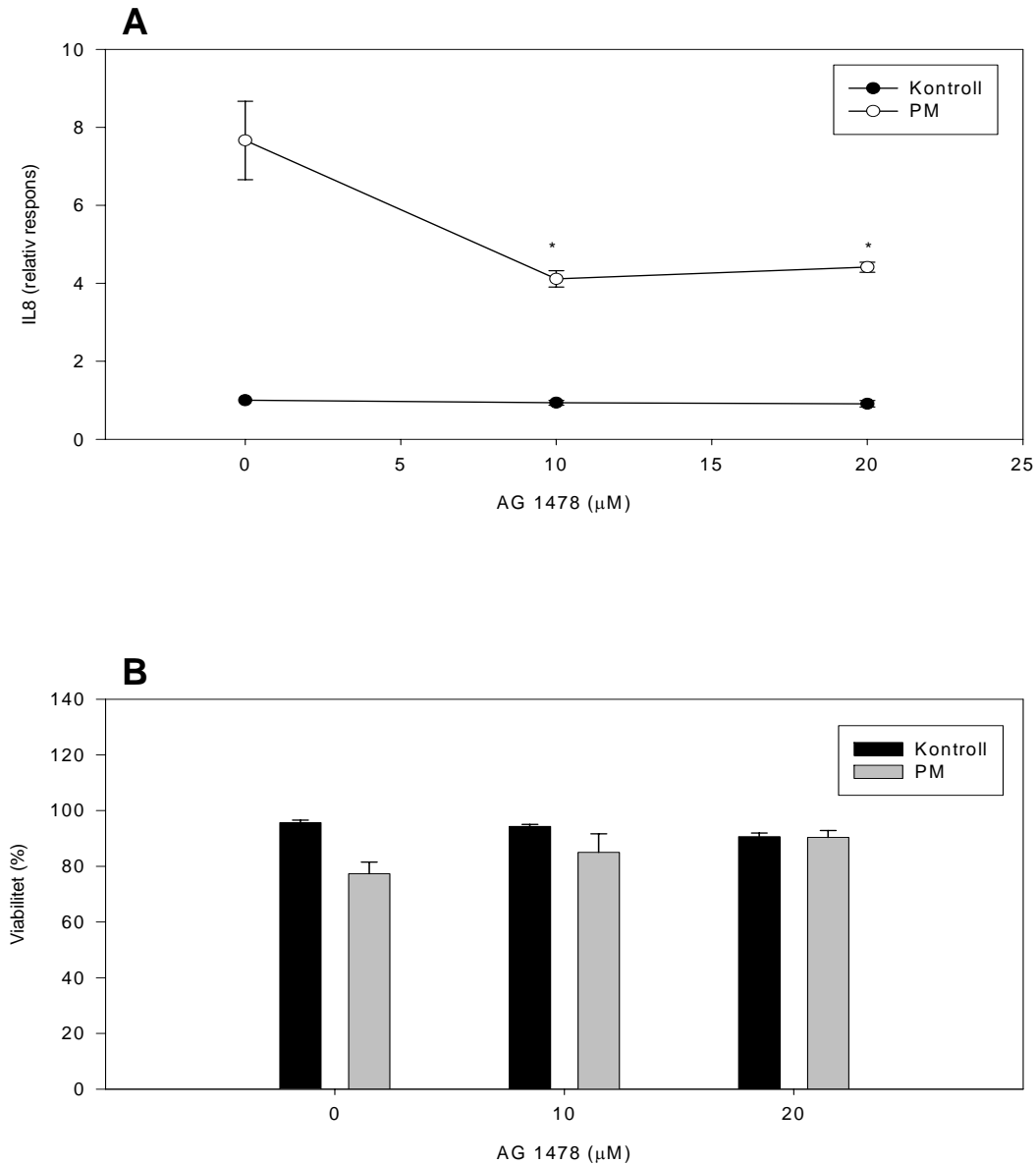
EGF-reseptor-aktivering: Fosforylert EGFR (molekylvekt: 170 kDa) initierer flere signalkaskader med ulike endepunkter, blant annet kan resultatet av denne fosforyleringen være aktivering av MAP-kinaser med påfølgende inflammatoriske responser (Hamilton et al., 2003; Wu et al., 2001). For å undersøke om sveiserøykpartiklene gir økt fosforylering av EGFR ble det utført immunopresipitering av EGFR og påfølgende Western blotting. Disse forsøkene viste at EGFR ble aktivert etter eksponering for partiklene (se Figur 25). Spesielt etter 2 timers eksponering var det en tydelig økt fosforylering av EGFR. Celler eksponert med 10 ng/ml EGF ble brukt som positiv kontroll.



Figur 25. Fosforylering av EGFR i A549-cellekulturer etter eksponering for sveiserøykpartikler. A549-cellekulturer ble tilsatt 500 µg/ml partikkelsuspensjon (+) og inkubert i 30 min, 2 timer eller 4 timer. Eksponering med EGF i 15 min er brukt som positiv kontroll. Figuren viser fosforylert EGFR. Deteksjon av proteinene ble foretatt ved Western blotting. Figuren viser et representativt blott (n=2).

Hemming av EGFR: Fosforylering av EGFR kan hemmes ved å bruke AG 1478. Dette ble brukt til å undersøke om EGFR var involvert i den observerte IL-8-responsen etter eksponering for sveiserøykpartikler. Resultatet er vist i Figur 26. Cellekulturer eksponert med AG 1478 ga en signifikant reduksjon i IL-8-nivå sammenlignet med eksponert kultur uten hemmer. Denne reduksjonen var på ca 50 % og var dermed ikke fullstendig. Basalnivået ble ikke påvirket av hemmeren.

Igjen ble viabiliteten bestemt ved mikroskopi. Det kunne se ut som om AG 1478 motvirket nedgangen i viabilitet etter eksponering for sveiserøykpartikler. Forskjellene var imidlertid små og ikke signifikante. Uansett kan ikke effektene av denne hemmeren på IL-8-responsene forklares ved redusert viabilitet.



Figur 26. Effekt av hemmer av EGFR på IL-8-frigjøring og viabilitet i A549-cellekulturer. Cellekulturer ble eksponert med 500 $\mu\text{g/ml}$ partikkelsuspensjon (PM). AG 1478 ble tilsatt 30 min før eksponeringsstart i konsentrasjoner på 0, 10 og 20 μM . **A:** IL-8-respons i A549-cellekulturer eksponert med sveiserøykpartikler og AG 1478. Responsen er angitt relativt til ikke-eksponerte kulturer (kontroll= 1001 ± 245 pg/ml IL-8). IL-8 ble målt som beskrevet under "Materiale og metoder". **B:** Viabilitet målt ved PI-opptak i eksponerte og ikke-eksponerte cellekulturer ved økende konsentrasjon av AG 1478. Resultatene er gitt som gjennomsnitt \pm SE (n=4). * Signifikant reduksjon i forhold til kulturer eksponert med sveiserøykpartikler uten hemmer tilstede ($p < 0,05$).

DISKUSJON

1.15 Etablering av kulturbetingelser

I denne oppgaven ble det benyttet en cellelinje av epiteliale lungeceller (A549-celler), trolig fra alveolære type 2-celler. Selv om dette er et godt etablert kultursystem ved vår avdeling ved Folkehelseinstituttet, ble forskjellige betingelser under eksponering med sveiserøykpartikler utprøvd. Tidligere studier med andre celletyper har vist at ulike kulturbetingelser blant annet med hensyn til serum i mediet, kan påvirke responsen ved eksponering for metaller (Okeson et al., 2004) og partikler (Barrett et al., 1999). Slike effekter kan skyldes ulike proteiner i serum. På grunn av sin funksjon som transportmolekyl, er det sannsynlig at albumin er et av disse proteinene. En stor del av ulike metaller og andre løselige komponenter vil kunne bindes til proteiner, og hindrer dermed kontakt med cellene. I tillegg vil noen proteiner "coate" partikkeloverflaten og på den måten kunne påvirke en eventuell cytotoxisk og/eller inflammatorisk respons. Eksponering uten proteiner tilstede var likevel utelukket, i og med at cellene da ikke vil fungere optimalt, blant annet ved at proteinsyntesen reduseres. Derfor ble det undersøkt hvorvidt det var noen forskjell i IL-8-respons i A549-celler som var eksponert for sveiserøykpartikler med enten serum (FKS) eller albumin (BSA) tilstede, og hvorvidt det hadde noen effekt på responsen å vente noen timer etter eksponeringsstart med å tilsette proteiner til kulturene.

Forsøkene viste at FKS ga signifikant høyere IL-8-frigjøring fra A549-celler enn BSA. Målinger viste en økning i frigjøring av IL-8 i celler eksponert for sveiserøykpartikler. Det var ingen forskjell i relativ respons på eksponering for sveiserøykpartikler i kulturene med FKS eller BSA. Tilsetning av FKS eller BSA ved eksponeringsstart eller 4 timer etter, synes heller ikke å spille noen større rolle. Det ble derfor valgt et regime med BSA tilsatt som supplement i de videre forsøkene. Dette valget ble gjort både fordi det ikke syntes å være store forskjeller i relativ respons, og fordi basal frigjøring av IL-8 lå noe lavere i kontroller tilsatt BSA. I tillegg ble systemet mer definert med kun BSA som supplement i stedet for FKS som inneholder flere proteiner i tillegg til albumin. Det er kjent at sammensetningen av FKS kan variere med ulike produksjonspartier av FKS som blir brukt, noe som kan bidra til varierende responser og dermed redusert reproducerbarhet.

Sammenligning av ulike BSA-konsentrasjoner viste lavere IL-8-respons ved 0,1 % BSA enn ved 0,5 % og 1 % BSA. Den relative responsen overfor sveiserøykpartiklene viste imidlertid ingen signifikante forskjeller i utskillelse av IL-8, men tendensen var en noe øket respons der det ble ventet i fire timer med tilsetning av BSA. Dette indikere på interaksjoner mellom partiklene og proteiner i mediet kan spille en viss rolle for IL-8-responsen i lungecellene, men dette kan imidlertid ikke ha så stor betydning.

1.16 Frigjøring av IL-8 fra lungeceller etter eksponering med sveiserøykpartikler

Langtidseksponering av arbeidere for sveiserøyk har i en rekke studier vist en sammenheng mellom inflammatoriske responser og påfølgende sykelighet (Antonini 2003; El Zein et al., 2005; Fidan et al., 2005; Jafari et al., 2004; Keskinen et al., 1980; Kim et al., 2005a). Eksperimentelle studier *in vitro* (Antonini et al., 1999; Baker et al., 1986; Hoofman et al., 1988; McNeilly et al., 2004) og *in vivo* (Antonini et al., 1997; Blanc et al., 1993; Contreras et al., 1997; Han et al., 2005; Hicks et al., 1984; McNeilly et al., 2005; Taylor et al., 2003) støtter opp om disse funnene. I samsvar med dette er det i denne oppgaven vist at sveiserøykpartikler induserer en konsentrasjonsavhengig økning i frigjøring av IL-8 fra A549-cellekulturer.

I dette arbeidet ble cytokinresponsen (IL-8) først påvist i cellekulturer eksponert for relativt høye doser av sveiserøykpartikler. Cellelinjer som A549 er ofte mindre sensitive overfor xenobiotika enn respektive primærceller. Med økende passasjetall kan responsen dessuten bli noe variabel, og dermed gi variasjoner i resultatene. Det antas at en IL-8 respons vil utløses ved lavere konsentrasjoner i primære type 2-celler enn A549-celler. Dette ble bekreftet i forsøk med primære type 2-celler fra rotte hvor det ble undersøkt en respons på en IL-8-analog i rotte, MIP-2, ble undersøkt. Det ble observert økt cytokinrespons, i tillegg til økt toksisitet, ved lavere konsentrasjoner av sveiserøykpartiklene enn i A549-cellene (data er ikke vist). Tilsvarende funn er gjort tidligere med andre typer partikler (Hetland et al., 2005; Ovrevik et al., 2004). Grunnen til at A549-celler er så robuste kan ha sammenheng med at denne cellelinjen har et høyt nivå at

antioksidanter, dette vil beskytte cellene mot mange forskjellige toksiske agens. Antioksidantprofilen kan imidlertid variere mellom de ulike subklonene av cellelinjen (Watanabe et al., 2002).

1.17 Betydning av sveiserøykpartiklers egenskaper for observert IL-8-respons

Immunresponser utløst av partikler er vist å kunne skyldes partikkelkjernen i seg selv, og komponenter som sitter mer eller mindre løst bundet til partiklene. Både løselig og uløselig partikkelfraksjon kan bestå av blant annet metaller (Ghio et al., 1999). Mange av disse er vist å føre til inflammatoriske responser. Reaktive oksygen forbindelser (ROS) kan genereres via metall-katalysert "Fenton-reaksjon" etter eksponering for partikler (Knaapen et al., 2002; Tao et al., 2003; Vallyathan et al., 1997). Overgangsmetaller og ROS kan føre til aktivering av transkripsjonsfaktorer og ekspresjon av pro-inflammatoriske cytokiner (Donaldson et al., 2002b; Knaapen et al., 2002; McNeilly et al., 2005; Rice et al., 2001; Riley et al., 2003). Andre viktige komponenter på partikkeloverflaten kan være endotoksiner, organiske og uorganiske forbindelser, gasser og allergener. Disse kan også gi inflammatoriske responser.

Dette studiet viste at uløselig fraksjon av sveiserøykpartikler alene ikke ga noen IL-8-respons, mens den løselige fraksjonen bare ga en liten økning i IL-8-nivå. Kombinasjonene av de to fraksjonene ga derimot en respons tilsvarende ubehandlet partikkelsuspensjon. Dette kan tolkes som at det sitter komponenter i både uløselig og løselig fraksjon som hver for seg ikke er tilstrekkelig for å utløse en betydelig inflammatorisk respons, men som sammen gir en synergieffekt med evne til å initiere en IL-8-respons fra cellekulturene.

Tidligere studier har vist at både løselig og uløselig del av partikler kan bidra til ulike partiklers inflammatoriske potensiale (Ghio et al., 1999; Knaapen et al., 2002; Taylor et al., 2003), noe som indikerer additive effekter og at maksimal respons kan utløses ved kombinasjon av begge fraksjonene. Men det er også vist at toksisitet og inflammatorisk respons kan skyldes bare løselig fraksjon (Carter et al., 1997; Knaapen 2000; Molinelli et al., 2002; Roberts et al., 2003b). For sveiserøykpartikler er det kun vist at løselig fraksjon kan gi inflammatorisk respons tilsvarende ubehandlede partikler (Antonini et al., 2005; McNeilly et al., 2004; McNeilly et al., 2005). Manglende eller svak effekt av hver av fraksjonene, og potensiering av effekt når cellene

eksponeres for begge av fraksjonene er det, så langt vår kunnskap rekker, ingen som har vist tidligere. Forklaringen på denne synergieffekten mellom uløselig og løselig fraksjon av sveiserøykpartikler med hensyn på utskillelse av IL-8 er ikke klar. Muligens kan metaller både i den uløselige og løselige fraksjonen være av betydning.

Metaller er vist å ha stor evne til å indusere en inflammatorisk respons, alene og i kombinasjon med andre metaller (Antonini et al., 1999; Becker et al., 2005; Riley et al., 2003). Det ble derfor undersøkt om det hadde noen effekt å eliminere overgangsmetaller fra løsningen, og om dette ville hindre effekten som kom som følge av kombinasjon av de to fraksjonene. Dette ble gjort ved å behandle partikkelsuspensjonen med en chelator, chelex. Denne chelatoren er tidligere vist å fjerne kationer fra en suspensjon av sveiserøykpartikler (McNeilly et al., 2004). I våre studier var det ingen forskjeller i respons når cellekulturene ble tilsatt løselig fraksjon behandlet med chelex i forhold til løselig fraksjon uten chelexbehandling. Ved kombinasjon av vasket, uløselig fraksjon med supernatanten fra chelexbehandlede partikler kom responsen igjen opp mot den som ble observert der cellekulturene hadde blitt eksponert for ubehandlet partikkelsuspensjon.

Resultatene i våre forsøk kan tyde på at det ikke er metaller i den løselige fraksjonen som bidrar til inflammatorisk respons av sveiserøykpartikler i A549-celler. I motsetning til dette fant McNeilly og medarbeidere at den stimulerende effekten av sveiserøykpartikler kun var avhengig av den løselige fraksjonen, og at den ble opphevet ved chelexbehandling av partiklene (McNeilly et al., 2004). Forklaringen på denne motsetningen mellom deres og våre studier er uklar. McNeilly og medarbeidere fant imidlertid cytotoksisitet og IL-8-frigjøring ved en tidel av dosen brukt i vårt tilfelle. Tre ulike typer sveiserøykpartikler med ulik potens ble sammenlignet. Det ble antatt at metallinnholdet var av betydning for partiklenes inflammatoriske potensiale i og med at dette var forskjellig i de ulike partiklene. I alle disse partiklene var metallinnholdet dominert av Cr (> 80 %). Bare den mest potente sveiserøykpartikkel-typen inneholdt Ti og V, mens alle partiklene inneholdt Cr, Mn, Ni og Fe. Også i et annet studie hvor løselig fraksjon ble regnet for å være ansvarlig for effekten av sveiserøykpartiklene ble det brukt partikler som stort sett inneholdt Cr (Antonini et al., 2005). Partiklene brukt i vårt tilfelle inneholdt hovedsaklig Fe, Mn og Mg og relativt lite Cr. De inneholdt imidlertid noe V. Variasjoner i både metallinnhold og

oksidasjonstall på metallene kan kanskje forklare forskjellen i inflammatorisk potensiale for de ulike partiklene.

På tross av at chelex ikke påvirker cytokinresponsen i vårt studie, kan det ikke utelukkes at metaller spiller en rolle. Det er relativt sannsynlig at flere av metallene ikke ble fullstendig fjernet fra løsningen da partiklene ble behandlet med chelex. Dette er tidligere vist av Molinelli og medarbeidere i forsøk med partikler samlet fra Utah Valley (Molinelli et al., 2002). I dette studiet ble ikke V fjernet i det hele tatt, mens ca 70% av Fe ble fjernet fra ekstraktet. Heller ikke all Ni, Al, Mn, Cu eller Zn ble fjernet fra disse partiklene. Etter chelexbehandling av en suspensjon av ROFA (Residual Oil Fly Ash)-partikler ble også V og Fe værende i løsning (Roberts et al., 2003b). Dermed er det sannsynlig at chelex bare opphever effekten av enkelte metaller. Det er også mulig at noen av de aktuelle metallene sitter fast på den uløselige partikkelfraksjonen, noe som vil kunne redusere effekten av chelexbehandlingen ytterligere. Det kan dermed ikke utelukkes at løselige/uløselige metaller er helt eller delvis ansvarlig for IL-8-responsen som utløses av sveiserøykpartikler.

En annen mulighet er at gjenværende ultrafine partikler i den løselige fraksjonen er med og utløser en IL-8-respons. Det er vist at man ikke får fjernet ultrafine partikler ved sentrifugering (Knaapen 2000). Dette betyr at vi ikke kan utelukke at den observerte IL-8-responsen i vårt tilfelle også kan skyldes ikke-aggregerte ultrafine partikler. Effekten av eventuelle ultrafine partikler i den løselige fraksjonen er liten, men kan muligens potensieres i kombinasjon med metaller i den uløselige fraksjonen. Til støtte for en slik mulig kombinasjonseffekt mellom ultrafine partikler og metaller, har Wilson og medarbeidere vist at ultrafine karbonpartikler *in vivo*-studier med rotter og *in vitro*-studier med makrofager hadde et større inflammatorisk potensiale når partiklene ble kombinert med metallsalter. Det ble foreslått at ultrafine partikler i egenskap av sin store overflate, særlig i kombinasjon med metaller, har stor oksidativ og inflammatorisk kapasitet både i cellefrie systemer og ved eksponering av rotter (Wilson et al., 2002).

Oksidativt stress er som nevnt foreslått å indusere pro-inflammatoriske effekter etter partikkeleksponering. Det er mulig at oksidativt stress må over et visst terskelnivå for å utløse respons, og at fraksjonene hver for seg ikke bidrar til høyt nok nivå av ROS og oksidativt stress. Ulike komponenter (inkludert metaller) som bidrar til oksidativt stress kan tenkes å forklare de observerte synergieffektene mellom de to partikkelfraksjonene. Økte ROS-nivåer intracellulært kan skyldes endringer i redokssyklus på grunn av økt nivå av ulike overgangsmetaller (Carter et al., 1997; Ghio et al., 1999; Gonzalez-Flecha 2004; Pascal et al., 2004). Alternativt kan økte ROS-nivåer skyldes en indirekte effekt på grunn av nedgang i intracellulært glutathion. ROS kan dannes på partikkeloverflaten eller intracellulært som følge av partikkeleksponering. For eksempel er forbrenning av organisk materiale som diesel vist å generere vedvarende frie radikaler. Det ble foreslått at semi-quinon-lignende radikaler adsorbert til partikkeloverflaten var ansvarlige for dette. Også endotoksiner bundet til partikkeloverflaten er vist å stimulere dannelsen av ROS og reaktive nitrogenforbindelser i flere celletyper (Tao et al., 2003). Det ble imidlertid ikke funnet endotoksiner i partikkelblandingen brukt i dette studiet (data ikke vist).

Knaapen og medarbeidere fant at uløselig fraksjon av svevestøv fra byluft kan indusere DNA-skade i A549-celler, sannsynligvis via intracellulær generering av hydroksyl-radikaler. Det ble antatt å skje via påvirkning av cellemembranen ved partikkelopptak og påfølgende lipidperoksidering. Denne effekten synes dessuten å bli forsterket i nærvær av overgangsmetaller som jern (Knaapen et al., 2002). Dette kan også være tilfellet i våre forsøk, gitt at det er tilstrekkelig med metaller tilstede til å initiere en reaksjon. Overgangsmetaller i spormengder er også vist å øke ROS-dannelse i cellefrie systemer (Gonzalez-Flecha 2004). Ghio og medarbeidere hemmet produksjon av både IL-8 og frie radikaler ved å benytte chelator og "scavengere" i humane bronkiale epiteliale cellekulturer etter eksponering for svevestøv fra North Provo. Denne effekten ble observert i cellekulturer eksponert med både løselig og uløselig fraksjon, og indikerer at metaller i begge fraksjonene kan være ansvarlige for oksidativt stress og biologisk effekt (Ghio et al., 1999).

1.18 Signalveier involvert i IL-8-respons etter eksponering for sveiserøykpartikler

MAP-kinasene ERK, p38 og JNK kan være viktige for optimal ekspresjon av IL-8-genet. Disse enzymene bidrar både ved aktivering av transkripsjonsfaktorer og ved posttranskripsjonelle mekanismer. MAP-kinase signalsystemet kan aktiveres via protein-tyrosin-kinaser, G-proteinkoblede reseptorer, cytokinreseptor og stresstimuli (Puddicombe et al., 2000). Denne aktiveringen kan forsterkes via hemming av fosfataser slik at aktiveringen av enzymene og dermed også immunresponsen blir vedvarende. I dette studiet ble aktivering av MAP-kinasene ERK, p38 og JNK i A549-celler undersøkt etter eksponering for sveiserøykpartikler. Det ble studert om aktivering av MAP-kinasene var involvert i IL-8-frigjøringen.

Resultatene i denne oppgaven viste en tydelig fosforylering av p38 etter eksponering for sveiserøykpartikler. Dette ble støttet av en signifikant reduksjon i frigjort IL-8 ved bruk av SB 202190, en hemmer av denne MAP-kinasen. Basalnivået ble ikke påvirket. Dette tyder på at aktivering av p38 har betydning for regulering av IL-8-respons ved eksponering for disse sveiserøykpartiklene. Aktivering av p38 synes også viktig for IL-8-responsen ved eksponering av lungeceller for andre typer partikler (Hashimoto et al., 2000; Kim et al., 2005b; Ovrevik et al., 2004; Swain et al., 2004). Også metaller kan aktivere MAP-kinaser (Samet et al., 1998). Metaller som V og Zn er kjente hemmere av flere fosfataser og vil derfor indirekte kunne føre til MAP-kinaseaktivering (Samet et al., 1999). Resultatene fra ulike studier varierer imidlertid sterkt med partikkel- og celletype. Det konkluderes ofte med at partikler gir aktivering av en eller flere MAP-kinaser, og at de i varierende grad er involvert i cytokindannelse. Dette viser en kompleks regulering med ulik respons på ulike stimuli. Bildet kompliseres ytterligere når man tar i betraktning de mange celletypene som benyttes i forskjellige studier, med varierende grad av overlapp i signalkaskadene i de ulike celletypene.

JNK1/2 er også vist å bli fosforylert etter eksponering for partikler (Li et al., 2002; Silbajoris et al., 2000). Hvorvidt JNK er involvert i vårt studie er noe usikkert, gitt at JNK2 ikke ble fosforylert, mens JNK1 syntes å bli det etter eksponering for sveiserøykpartikler (Figur 23). Dette indikerer at kun JNK1 er involvert i observert IL-8-respons. Su og medarbeidere viser blant annet at MKK4, avhengig av oppstrøms signaler, kan aktivere isoformene av JNK i ulik grad (Su et al., 2006). I våre forsøk var det en svak, men ikke signifikant nedgang i IL-8-respons i forsøk der eksponerte cellekulturer var tilsatt en hemmer av JNK, SP 600125.

Forsøk med hemmer av signalveien til ERK1/2, PD 98059, kunne indikere at ERK1/2 var involvert i IL-8 frigjøringen, selv om nedgangen i IL-8-respons ikke var signifikant. Den basale frigjøringen av IL-8 ble imidlertid påvirket relativt sett i omtrent samme størrelsesorden. Videre ga ikke sveiserøykpartiklene noen økt fosforylering av ERK1/2. Resultatene viser derfor ikke noen klar rolle for ERK1/2 i IL-8-respons utløst av sveiserøykpartikler. Flere studier viser imidlertid at andre typer partikler aktiverer ERK1/2 (Blanchet et al., 2004; Cho et al., 1999; Ovrevik et al., 2004; Roberts et al., 2003a). På den annen side er utskillelse av IL-8 etter aktivering av p38, og ikke ERK1/2, også vist for blant annet dieseleksos-partikler i humane bronkiale epitelceller (Hashimoto et al., 2000). Det er mulig at den basale aktiviteten av ERK1/2 er nødvendig for maksimal ekspresjon av IL-8. Videre er det vist at PD 98059 ikke er så spesifikk som tidligere antatt. I tillegg til ERK1/2, synes både JNK og ERK5 å bli påvirket av denne hemmeren (Kamakura et al., 1999; Salh et al., 2000). Den svake reduksjonen i IL-8-respons ved eksponering for sveiserøyk med PD 98059 tilstede, kunne skyldes slike ikke-spesifikke effekter, eventuelt at ERK1/2 ikke er involvert i det hele tatt.

Fra basale studier er det kjent at MAP-kinasene og deres kaskader har en viss grad av overlapp og at de kan regulere aktiviteten av hverandre og seg selv, både direkte og indirekte (Hommes et al., 2003; Puddicombe et al., 2000). Som substrat for felles oppstrøms enzymer, vil blokkering av en MAP-kinase kunne påvirke de andre MAP-kinasene. Derfor er det mulig at en kombinert hemming av de ulike kinasene ville gitt additive effekter på utskillelse av IL-8 ved eksponering av A549-cellene for sveiserøykpartikler. Dette ville det vært av interesse å undersøke.

Det er også muligheter for "crosstalk" mellom de ulike MAP-kinasene. Det finnes defosforylerende fosfataser som begrenser MAP-kinasenes aktivitet. For eksempel er p38 vist å blokkere ERK1/2-signalveien via aktivering av protein-fosfatase 1 (PP1) og PP2A som hemmer MEK1 og 2 (Westermarck et al., 2001). Zn^{2+} som inhiberer fosfatase-aktivitet vil dermed kunne aktivere MAP-kinaser, og er videre vist å føre til aktivering av AP-1 og påfølgende utskillelse av IL-8 i humane luftveis-epitelceller (Kim et al., 2005c). Spesifisiteten til fosfataser er imidlertid lav, slik at aktivering av en MAP-kinase kan resultere i deaktivering av en annen, som nevnt over. "Crosstalk" kan dermed resultere i både samvirkende og hemmende effekter.

Som beskrevet tidligere kan aktivering av MAP-kinasene være årsak til inflammatorisk respons, slik også våre resultater tyder på. Hvilke oppstrøms signaler til MAP-kinasene som er involvert er av stor interesse. Ikke-reseptor-tyrosin-kinaser, som for eksempel c-Src, kan være involvert oppstrøms for MAP-kinasene. Ved eksponering av A549-celler for krystallinsk silika er det vist at c-Src er en vesentlig faktor ved aktivering av ERK1/2 og p38 (Ovrevik et al., 2004). Flere studier viser at også EGFR er involvert i partikkel-indusert cytokinfrigjøring (Tamaoki et al., 2004; Wu et al., 2001). Denne reseptoren er som nevnt svært ligand-spesifikk og interaksjon mellom partikkel og EGFR kan vanskelig forklares. En mer sannsynlig forklaring for partikkel-indusert aktivering av EGFR er via andre indirekte mekanismer, som for eksempel aktivering via c-Src. Churg og medarbeidere foreslår at partikler som inneholder jern kan generere en inflammatorisk respons via kontakt mellom epitelet og partikkelen, og at responsen skyldes fosforylering av EGFR via c-Src (Churg et al., 2005). EGFR kan også aktiveres av ROS eller metaller via transaktiverende mekanismer (Wu et al., 1999).

I våre studier førte eksponering for sveiserøykpartikler til fosforylering av EGFR. Videre ga en blokkering av reseptoren med antagonist AG 1478 redusert IL-8-respons. Effekten av AG 1478 var bare delvis, hvilket kan indikere både EGFR-avhengige og -uavhengige mekanismer for IL-8-frigjøring. Det kan derfor ikke utelukkes at noe av responsen også skyldes effekter på andre reseptorer eller opptak av partikler eller løselige komponenter intracellulært.

I denne oppgaven er det ikke kartlagt hvordan relasjonen er mellom fosforylert EGFR og aktivering av ulike MAP-kinaser. Det er heller ikke undersøkt hvordan c-Src (eller andre SFKer) er involvert i aktivering av EGFR, eller hvorvidt SFK medierer effekt på MAP-kinasene uavhengig av EGFR. I enkelte studier med andre typer partikler er imidlertid dette blitt belyst (Ovrevik et al., 2004; Wu et al., 2002a). Eksempelvis er aktivering av EGFR vist å regulere utskillelse av IL-8 ved eksponering av humane epitelceller for svevestøv fra Utah Valley. Aktiveringen av EGFR ble koblet til aktivering av ERK1/2 (Wu et al., 2001). EGFR-avhengig fosforylering av ERK1/2 er godt dokumentert, og er dessuten vist ved eksponering av lungeceller for andre typer partikler (Blanchet et al., 2004; Tamaoki et al., 2004; Vallyathan et al., 1997) og metaller (Wu et al., 1999). At det ikke ble observert økt fosforylering av ERK1/2 i vårt tilfelle kan muligens ha sammenheng med høy basalaktivitet av ERK1/2 i cellene, og at dette er tilstrekkelig for aktivering av substrater nedstrøms for denne MAP-kinasen. I humane epiteliale lungeceller er EGFR vist å være involvert i aktivering av Ras oppstrøms for ERK1/2. Ras-aktivering resulterte i fosforylering av ERK1/2 etter eksponering av lungecellene for As og Zn, men ikke V. V ga imidlertid ROS og translokering av NF- κ B til kjernen, i motsetning til As og Zn (Wu et al., 2002b). Dette indikerer ERK-avhengig og –uavhengig signalisering etter eksponering for ulike agens. Det er også en mulighet at EGFR aktiverer c-Src som igjen fosforylerer p38 og/eller JNK, slik at ERK1/2 ikke involveres. Som nevnt kan deler av signaliseringen gå via c-Src, eller andre enzymer eller reseptorer, til aktivering av p38, altså utenom EGFR. Ved eksponering av A549-celler for V er det imidlertid vist at p38 fosforyleres ved signalisering via EGFR (Chien et al., 2006). EGFR har også gitt aktivering av JNK i tillegg til de andre MAP-kinasene (Zhang et al., 2005). Det kan dermed tenkes at EGFR er delvis involvert i partikkelmediert aktivering av p38 og eventuelt JNK i vårt tilfelle, og at dette er viktige deler av mekanismen for IL-8-frigjøringen utløst av sveiserøykpartikler. En naturlig oppfølging av denne oppgaven vil være å studere reaksjoner diskutert ovenfor. Dermed vil man kunne kaste lys over signalkjeden som fører til økt cytokindannelse etter eksponering for sveiserøyk.

KONKLUSJONER

- I dette arbeidet ble det etablert betingelser for eksponering av A549-celler for sveiserøykpartikler for å studere stressresponser som cytokinfrigjøring og cytotoxiskitet. Et serumfritt medium med tilsetning av 0,5 % BSA 4 timer etter eksponeringsstart ble valgt. A549-cellekulturer dyrket ved disse betingelsene synes som et egnet system for studier av cytokinresponser på sveiserøykpartikler.
- Sveiserøykpartiklene forårsaket en konsentrasjonsavhengig økning i IL-8-frigjøring fra A549-cellekulturer. Eksponering for partiklene påvirket lungecellenes vitalitet i liten grad.
- IL-1 β ble ikke påvist. IL-8-responsen ble heller ikke redusert ved blokkering av IL-1-reseptoren med antagonist. IL-1 β synes derfor ikke å ha noen viktig rolle i reguleringen av IL-8-responsen forårsaket av sveiserøykpartikler i A549-cellene.
- Sveiserøykpartiklene førte til en IL-8-respons som kunne synes å være avhengig av både løselig og uløselig fraksjon. Det ble ikke observert noen økning i IL-8-frigjøring når lungecellene ble eksponert for uløselig fraksjon, og kun en liten relativ økning i IL-8-nivå fra celler eksponert med løselig fraksjon. Ved kombinasjon av de to fraksjonene var IL-8-frigjøringen den samme som ved eksponering for ubehandlede sveiserøykpartikler. Hvilke komponenter som er ansvarlige for denne effekten er fortsatt uklart.
- Resultatene tyder på at aktivering av EGFR og MAP-kinasen p38 er involvert i regulering av IL-8-respons etter eksponering for sveiserøykpartikler. Aktivering av JNK kan muligens være involvert, mens ERK1/2 ikke synes å være involvert i IL-8-frigjøringen i vårt celledsystem.

REFERANSER

Active Motif. Nuclear reseptor ELISAs, [www.activemotif.com/.../ products/nr_sandwich.jpg](http://www.activemotif.com/.../products/nr_sandwich.jpg). 2006.

Ref Type: Generic

Ahmad, A., Bayley, D. L., He, S., Stockley, R. A., 2003. Myeloid related protein-8/14 stimulates interleukin-8 production in airway epithelial cells, *Am J Respir. Cell. Mol. Biol.* 29, 523-530.

Antonini, J. M., 2003. Health effects of welding, *Crit Rev Toxicol.* 33, 61-103.

Antonini, J. M., Clarke, R. W., Krishna Murthy, G. G., Sreekanthan, P., Jenkins, N., Eagar, T. W., Brain, J. D., 1998. Freshly generated stainless steel welding fume induces greater lung inflammation in rats as compared to aged fume, *Toxicol Lett.* 98, 77-86.

Antonini, J. M., Krishna Murthy, G. G., Brain, J. D., 1997. Responses to welding fumes: lung injury, inflammation, and the release of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta, *Exp Lung Res.* 23, 205-227.

Antonini, J. M., Krishna Murthy, G. G., Rogers, R. A., Albert, R., Ulrich, G. D., Brain, J. D., 1996. Pneumotoxicity and pulmonary clearance of different welding fumes after intratracheal instillation in the rat, *Toxicol Appl Pharmacol.* 140, 188-199.

Antonini, J. M., Lawryk, N. J., Murthy, G. G., Brain, J. D., 1999. Effect of welding fume solubility on lung macrophage viability and function in vitro, *J Toxicol Environ Health A.* 58, 343-363.

Antonini, J. M., Leonard, S. S., Roberts, J. R., Solano-Lopez, C., Young, S. H., Shi, X. L., Taylor, M. D., 2005. Effect of stainless steel manual metal arc welding fume on free radical production, DNA damage, and apoptosis induction, *Mol. Cell. Biochem.* 279, 17-23.

Antonini, J. M., Taylor, M. D., Zimmer, A. T., Roberts, J. R., 2004. Pulmonary responses to welding fumes: role of metal constituents, *J Toxicol Environ Health A.* 67, 233-249.

Baker, R. S., Arlauskas, A., Tandon, R. K., Crisp, P. T., Ellis, J., 1986. Toxic and genotoxic action of electric-arc welding fumes on cultured mammalian cells, *J Appl. Toxicol.* 6, 357-362.

Barrett, E. G., Johnston, C., Oberdorster, G., Finkelstein, J. N., 1999. Silica binds serum proteins resulting in a shift of the dose-response for silica-induced chemokine expression in an alveolar type II cell line, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 161, 111-122.

Becker, S., Dailey, L. A., Soukup, J. M., Grambow, S. C., Devlin, R. B., Huang, Y. C., 2005. Seasonal variations in air pollution particle-induced inflammatory mediator release and oxidative stress, *Environ Health Perspect.* 113, 1032-1038.

Bishop, A. E., 2004. Pulmonary epithelial stem cells, *Cell. Prolif.* 37, 89-96.

- Blanc, P. D., Boushey, H. A., Wong, H., Wintermeyer, S. F., Bernstein, M. S., 1993. Cytokines in metal fume fever, *Am Rev Respir Dis.* 147, 134-138.
- Blanchet, S., Ramgolam, K., Baulig, A., Marano, F., Baeza-Squiban, A., 2004. Fine particulate matter induces amphiregulin secretion by bronchial epithelial cells, *Am J Respir. Cell. Mol. Biol.* 30, 421-427.
- Block, G. T. Yeung, M., 1982. Asthma induced by nickel, *JAMA.* 247, 1600-1602.
- Blount, B. W., 1990. Two types of metal fume fever: mild vs. serious, *Mil. Med.* 155, 372-377.
- Bortnick, A. E., Favari, E., Tao, J. Q., Francone, O. L., Reilly, M., Zhang, Y., Rothblat, G. H., Bates, S. R., 2003. Identification and characterization of rodent ABCA1 in isolated type II pneumocytes, *Am J Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 285, L869-L878.
- Brook, R. D., Franklin, B., Cascio, W., Hong, Y., Howard, G., Lipsett, M., Luepker, R., Mittleman, M., Samet, J., Smith, S. C., Jr., Tager, I., 2004. Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association, *Circulation.* 109, 2655-2671.
- Brown, J. S., Zeman, K. L., Bennett, W. D., 2002. Ultrafine particle deposition and clearance in the healthy and obstructed lung, *Am J Respir. Crit. Care Med.* 166, 1240-1247.
- Brunekreef, B. Holgate, S. T., 2002. Air pollution and health, *The Lancet.* 360, 1233-1242.
- Buerke, U., Schneider, J., Rosler, J., Woitowitz, H. J., 2002. Interstitial pulmonary fibrosis after severe exposure to welding fumes, *Am J Ind. Med.* 41, 259-268.
- Carter, J. D., Ghio, A. J., Samet, J. M., Devlin, R. B., 1997. Cytokine production by human airway epithelial cells after exposure to an air pollution particle is metal-dependent, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 146, 180-188.
- Chang, Y. H., Hsieh, S. L., Chen, M. C., Lin, W. W., 2002. Lymphotoxin beta receptor induces interleukin 8 gene expression via NF-kappaB and AP-1 activation, *Exp. Cell. Res.* 278, 166-174.
- Chien, P. S., Mak, O. T., Huang, H. J., 2006. Induction of COX-2 protein expression by vanadate in A549 human lung carcinoma cell line through EGF receptor and p38 MAPK-mediated pathway, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339, 562-568.
- Cho, Y. J., Seo, M. S., Kim, J. K., Lim, Y., Chae, G., Ha, K. S., Lee, K. H., 1999. Silica-induced generation of reactive oxygen species in Rat2 fibroblast: role in activation of mitogen-activated protein kinase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262, 708-712.
- Chung, K. F., 2001. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease, *Eur. Respir. J Suppl.* 34, 50s-59s.

- Churg, A., Xie, C., Wang, X., Vincent, R., Wang, R. D., 2005. Air pollution particles activate NF-kappaB on contact with airway epithelial cell surfaces, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 208, 37-45.
- Contreras, G. R. Chan-Yeung, M., 1997. Bronchial reactions to exposure to welding fumes, *Occup Environ Med.* 54, 836-839.
- Curtis D.Klaassen 2001a. Toxic responses of the immune system. In: Curtis D.Klaassen, (ed.), Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons, McGraw-Hill, Kansas City, pp. 422-423.
- Curtis D.Klaassen 2001b. Toxic responses of the respiratory system. In: Curtis D.Klaassen, (ed.), **Casarett and Doull's** Toxicology: The basic science of poisons, McGraw-Hill, p. 522.
- Darzynkiewicz, Z., Juan, G., Li, X., Gorczyca, W., Murakami, T., Traganos, F., 1997. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis), *Cytometry.* 27, 1-20.
- Donaldson, K., Brown, D., Clouter, A., Duffin, R., MacNee, W., Renwick, L., Tran, L., Stone, V., 2002a. The pulmonary toxicology of ultrafine particles, *J Aerosol. Med.* 15, 213-220.
- Donaldson, K., Mills, N., MacNee, W., Robinson, S., Newby, D., 2005a. Role of inflammation in cardiopulmonary health effects of PM, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207, 483-488.
- Donaldson, K. Tran, C. L., 2002b. Inflammation caused by particles and fibers, *Inhal. Toxicol.* 14, 5-27.
- Donaldson, K., Tran, L., Jimenez, L. A., Duffin, R., Newby, D. E., Mills, N., MacNee, W., Stone, V., 2005b. Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure, *Part. Fibre. Toxicol.* 2, 10.
- Edinger, A. L. Thompson, C. B., 2004. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy, *Curr Opin. Cell. Biol.* 16, 663-669.
- El Zein, M., Infante-Rivard, C., Malo, J. L., Gautrin, D., 2005. Is metal fume fever a determinant of welding related respiratory symptoms and/or increased bronchial responsiveness? A longitudinal study, *Occup. Environ. Med.* 62, 688-694.
- Fehrenbach, H., 2001. Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited, *Respir. Res.* 2, 33-46.
- Fidan, F., Unlu, M., Koken, T., Tetik, L., Akgun, S., Demirel, R., Serteser, M., 2005. Oxidant-antioxidant status and pulmonary function in welding workers, *J Occup. Health.* 47, 286-292.
- Ghio, A. J., Stonehuerner, J., Dailey, L. A., Carter, J. D., 1999. Metals associated with both the water-soluble and insoluble fractions of an ambient air pollution particle catalyze an oxidative stress, *Inhal. Toxicol.* 11, 37-49.

- Gonzalez-Flecha, B., 2004. Oxidant mechanisms in response to ambient air particles, *Mol. Aspects. Med.* 25, 169-182.
- Graeme, K. A. Pollack, C. V., Jr., 1998. Heavy metal toxicity, part II: lead and metal fume fever, *J Emerg. Med.* 16, 171-177.
- Graves, D. T. Jiang, Y., 1995. Chemokines, a family of chemotactic cytokines, *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 6, 109-118.
- Hamilton, L. M., Torres-Lozano, C., Puddicombe, S. M., Richter, A., Kimber, I., Dearman, R. J., Vrugt, B., Aalbers, R., Holgate, S. T., Djukanovic, R., Wilson, S. J., Davies, D. E., 2003. The role of the epidermal growth factor receptor in sustaining neutrophil inflammation in severe asthma, *Clin. Exp. Allergy.* 33, 233-240.
- Han, S. G., Kim, Y., Kashon, M. L., Pack, D., Castranova, V., Vallyathan, V., 2005. Correlates of Oxidative Stress and Free Radical Activity in Asymptomatic Shipyard Welders' Serum, *Am J Respir Crit Care Med.*
- Hashimoto, S., Gon, Y., Takeshita, I., Matsumoto, K., Jibiki, I., Takizawa, H., Kudoh, S., Horie, T., 2000. Diesel exhaust particles activate p38 MAP kinase to produce interleukin 8 and RANTES by human bronchial epithelial cells and N-acetylcysteine attenuates p38 MAP kinase activation, *Am J Respir. Crit. Care Med.* 161, 280-285.
- Hashimoto, S., Matsumoto, K., Gon, Y., Maruoka, S., Takeshita, I., Hayashi, S., Koura, T., Kujime, K., Horie, T., 1999. p38 Mitogen-activated protein kinase regulates IL-8 expression in human pulmonary vascular endothelial cells, *Eur. Respir. J.* 13, 1357-1364.
- Hetland, R. B., Cassee, F. R., Lag, M., Refsnes, M., Dybing, E., Schwarze, P. E., 2005. Cytokine release from alveolar macrophages exposed to ambient particulate matter: heterogeneity in relation to size, city and season, *Part. Fibre. Toxicol.* 2, 4.
- Heyder, J., 2004. Deposition of inhaled particles in the human respiratory tract and consequences for regional targeting in respiratory drug delivery, *Proc. Am Thorac. Soc.* 1, 315-320.
- Hicks, R., Lam, H. F., Al Shamma, K. J., Hewitt, P. J., 1984. Pneumoconiotic effects of welding-fume particles from mild and stainless steel deposited in the lung of the rat, *Arch Toxicol.* 55, 1-10.
- Hoefen, R. J. Berk, B. C., 2002. The role of MAP kinases in endothelial activation, *Vascul. Pharmacol.* 38, 271-273.
- Hommes, D. W., Peppelenbosch, M. P., van Deventer, S. J., 2003. Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets, *Gut.* 52, 144-151.
- Hooftman, R. N., Arkesteijn, C. W., Roza, P., 1988. Cytotoxicity of some types of welding fume particles to bovine alveolar macrophages, *Ann. Occup. Hyg.* 32, 95-102.

Hsu, H. Y., Chiu, S. L., Wen, M. H., Chen, K. Y., Hua, K. F., 2001. Ligands of macrophage scavenger receptor induce cytokine expression via differential modulation of protein kinase signaling pathways, *J Biol. Chem.* 276, 28719-28730.

Invitrogen. Direct or indirect capture?

<https://catalog.invitrogen.com/productImages/3700/3662.JPG>. 2006.

Ref Type: Generic

Ishii, H., Fujii, T., Hogg, J. C., Hayashi, S., Mukae, H., Vincent, R., van Eeden, S. F., 2004. Contribution of IL-1 beta and TNF-alpha to the initiation of the peripheral lung response to atmospheric particulates (PM10), *Am J Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 287, L176-L183.

J.R.Crowther. Enzyme linked immunosorbent assay,

<http://www.iaea.org/programmes/nafa/d3/public/ras-ai-elisai.pdf>. 2006. **Joint FAO,IEAE Division, Vienna.**

Ref Type: Generic

Jafari, A. J. Assari, M. J., 2004. Respiratory effects from work-related exposure to welding fumes in Hamadan, Iran, *Arch Environ. Health.* 59, 116-120.

James, A. C., Stahlhofen, W., Rudolf, G., Kobrich, R., Briant, J. K., Egan, M. J., Nixon, W., Birchall, A., 1994. Annexe D. deposition of inhaled particles, *Ann. ICRP.* 24, 231-299.

Jeffery, P. K., 1987. The origins of secretions in the lower respiratory tract, *Eur. J Respir. Dis. Suppl.* 153, 34-42.

Jiang, A., Craxton, A., Kurosaki, T., Clark, E. A., 1998. Different protein tyrosine kinases are required for B cell antigen receptor-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase, c-Jun NH2-terminal kinase 1, and p38 mitogen-activated protein kinase, *J Exp. Med.* 188, 1297-1306.

Kamakura, S., Moriguchi, T., Nishida, E., 1999. Activation of the protein kinase ERK5/BMK1 by receptor tyrosine kinases. Identification and characterization of a signaling pathway to the nucleus, *J Biol. Chem.* 274, 26563-26571.

Keskinen, H., Kalliomaki, P. L., Alanko, K., 1980. Occupational asthma due to stainless steel welding fumes, *Clin. Allergy.* 10, 151-159.

Kim, J. Y., Chen, J. C., Boyce, P. D., Christiani, D. C., 2005a. Exposure to welding fumes is associated with acute systemic inflammatory responses, *Occup. Environ. Med.* 62, 157-163.

Kim, Y. M., Reed, W., Lenz, A. G., Jaspers, I., Silbajoris, R., Nick, H. S., Samet, J. M., 2005b. Ultrafine carbon particles induce interleukin-8 gene transcription and p38 MAPK activation in normal human bronchial epithelial cells, *Am J Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 288, L432-L441.

Kim, Y. M., Reed, W., Wu, W., Bromberg, P. A., Graves, L. M., Samet, J. M., 2005c. Zn²⁺-induced IL-8 expression involves AP-1, JNK, and ERK activities in human airway epithelial cells, *Am J Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*

Kitagawa, D., Tanemura, S., Ohata, S., Shimizu, N., Seo, J., Nishitai, G., Watanabe, T., Nakagawa, K., Kishimoto, H., Wada, T., Tezuka, T., Yamamoto, T., Nishina, H., Katada, T., 2002. Activation of extracellular signal-regulated kinase by ultraviolet is mediated through Src-dependent epidermal growth factor receptor phosphorylation. Its implication in an anti-apoptotic function, *J Biol. Chem.* 277, 366-371.

Knaapen, A. M., Shi, T., Borm, P. J., Schins, R. P., 2002. Soluble metals as well as the insoluble particle fraction are involved in cellular DNA damage induced by particulate matter, *Mol. Cell. Biochem.* 234-235, 317-326.

Knaapen, A., 2000. Ambient particulate matter induces oxidative DNA damage in lung epithelial cells, *Inhal. Toxicol.* 12, 125-132.

Laing, K. J. Secombes, C. J., 2004. Chemokines, *Dev. Comp. Immunol.* 28, 443-460.

Li, N., Wang, M., Oberley, T. D., Sempf, J. M., Nel, A. E., 2002. Comparison of the pro-oxidative and proinflammatory effects of organic diesel exhaust particle chemicals in bronchial epithelial cells and macrophages, *J Immunol.* 169, 4531-4541.

Lockshin, R. A. Zakeri, Z., 2004. Apoptosis, autophagy, and more, *Int. J Biochem. Cell. Biol.* 36, 2405-2419.

Luttrell, L. M., Hawes, B. E., van Biesen, T., Luttrell, D. K., Lansing, T. J., Lefkowitz, R. J., 1996. Role of c-Src tyrosine kinase in G protein-coupled receptor- and Gbetagamma subunit-mediated activation of mitogen-activated protein kinases, *J Biol. Chem.* 271, 19443-19450.

Malhotra, V., Shanley, T. P., Pittet, J. F., Welch, W. J., Wong, H. R., 2001. Geldanamycin inhibits NF-kappaB activation and interleukin-8 gene expression in cultured human respiratory epithelium, *Am J Respir. Cell. Mol. Biol.* 25, 92-97.

Malo, J. L. Cartier, A., 1987. Occupational asthma due to fumes of galvanized metal, *Chest.* 92, 375-377.

Malo, J. L., Cartier, A., Doepner, M., Nieboer, E., Evans, S., Dolovich, J., 1982. Occupational asthma caused by nickel sulfate, *J Allergy Clin. Immunol.* 69, 55-59.

McNeilly, J. D., Heal, M. R., Beverland, I. J., Howe, A., Gibson, M. D., Hibbs, L. R., MacNee, W., Donaldson, K., 2004. Soluble transition metals cause the pro-inflammatory effects of welding fumes in vitro, *Toxicol Appl Pharmacol.* 196, 95-107.

McNeilly, J. D., Jimenez, L. A., Clay, M. F., MacNee, W., Howe, A., Heal, M. R., Beverland, I. J., Donaldson, K., 2005. Soluble transition metals in welding fumes cause inflammation via activation of NF-kappaB and AP-1, *Toxicol Lett.* 158, 152-157.

- Meo, S. A. Al Khelaiwi, T., 2003. Health hazards of welding fumes, Saudi. Med J. 24, 1176-1182.
- Merchant, J. Webby, R., 2001. Metal fume fever: a case report and literature review, Emerg. Med (Fremantle.). 13, 373-375.
- Mocsai, A., Jakus, Z., Vantus, T., Berton, G., Lowell, C. A., Ligeti, E., 2000. Kinase pathways in chemoattractant-induced degranulation of neutrophils: the role of p38 mitogen-activated protein kinase activated by Src family kinases, J Immunol. 164, 4321-4331.
- Molinelli, A. R., Madden, M. C., McGee, J. K., Stonehuerner, J. G., Ghio, A. J., 2002. Effect of metal removal on the toxicity of airborne particulate matter from the Utah Valley, Inhal. Toxicol. 14, 1069-1086.
- Mukaida, N., 2003. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases, Am J Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 284, L566-L577.
- Mukaida, N., Mahe, Y., Matsushima, K., 1990. Cooperative interaction of nuclear factor-kappa B- and cis-regulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by pro-inflammatory cytokines, J Biol. Chem. 265, 21128-21133.
- Mukaida, N., Matsumoto, T., Yokoi, K., Harada, A., Matsushima, K., 1998. Inhibition of neutrophil-mediated acute inflammation injury by an antibody against interleukin-8 (IL-8), Inflamm. Res. 47 Suppl 3, S151-S157.
- Nemery, B., 1990. Metal toxicity and the respiratory tract, Eur. Respir. J. 3, 202-219.
- Nemmar, A., Hamoir, J., Nemery, B., Gustin, P., 2005. Evaluation of particle translocation across the alveolo-capillary barrier in isolated perfused rabbit lung model, Toxicology. 208, 105-113.
- Nemmar, A., Hoet, P. H., Vanquickenborne, B., Dinsdale, D., Thomeer, M., Hoylaerts, M. F., Vanbilloen, H., Mortelmans, L., Nemery, B., 2002. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans, Circulation. 105, 411-414.
- Obata, T., Brown, G. E., Yaffe, M. B., 2000. MAP kinase pathways activated by stress: the p38 MAPK pathway, Crit. Care Med. 28, N67-N77.
- Oberdorster, G., 2001. Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles, Int. Arch Occup. Environ. Health. 74, 1-8.
- Oberdorster, G., Oberdorster, E., Oberdorster, J., 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles, Environ. Health Perspect. 113, 823-839.
- Okada, H. Mak, T. W., 2004. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells, Nat. Rev. Cancer. 4, 592-603.
- Okeson, C. D., Riley, M. R., Riley-Saxton, E., 2004. In vitro alveolar cytotoxicity of soluble components of airborne particulate matter: effects of serum on toxicity of transition metals, Toxicol. In Vitro. 18, 673-680.

Ormestad, H. Svevestøvspartikler i innemiljøet og allergi. Tidsskrift for Den Norske Laegeforening 121, 1344-1350. 2001.

Ref Type: Generic

Ovrevik, J., Lag, M., Schwarze, P., Refsnes, M., 2004. p38 and Src-ERK1/2 pathways regulate crystalline silica-induced chemokine release in pulmonary epithelial cells, Toxicol. Sci. 81, 480-490.

Pascal, L. E. Tessier, D. M., 2004. Cytotoxicity of chromium and manganese to lung epithelial cells in vitro, Toxicol. Lett. 147, 143-151.

Pearson, G., Robinson, F., Beers, G. T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K., Cobb, M. H., 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions, Endocr Rev. 22, 153-183.

Penn, A., Murphy, G., Barker, S., Henk, W., Penn, L., 2005. Combustion-derived ultrafine particles transport organic toxicants to target respiratory cells, Environ. Health Perspect. 113, 956-963.

Pope, C. A., III, 2000. Epidemiology of fine particulate air pollution and human health: biologic mechanisms and who's at risk?, Environ. Health Perspect. 108 Suppl 4, 713-723.

Puddicombe, S. M. Davies, D. E., 2000. The role of MAP kinases in intracellular signal transduction in bronchial epithelium, Clin. Exp. Allergy. 30, 7-11.

Qi, M. Elion, E. A., 2005. MAP kinase pathways, J Cell. Sci. 118, 3569-3572.

Raffray, M. Cohen, G. M., 1997. Apoptosis and necrosis in toxicology: a continuum or distinct modes of cell death?, Pharmacol. Ther. 75, 153-177.

Rahman, I. MacNee, W., 2000. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation, Eur. Respir. J. 16, 534-554.

Raingeaud, J., Whitmarsh, A. J., Barrett, T., Derijard, B., Davis, R. J., 1996. MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway, Mol. Cell. Biol. 16, 1247-1255.

Refsnes, M., Thrane, E. V., Lag, M., Hege, T. G., Schwarze, P. E., 2001. Mechanisms in fluoride-induced interleukin-8 synthesis in human lung epithelial cells, Toxicology. 167, 145-158.

Remick, D. G., 2005. Interleukin-8, Crit. Care Med. 33, S466-S467.

Rice, T. M., Clarke, R. W., Godleski, J. J., Al Mutairi, E., Jiang, N. F., Hauser, R., Paulauskis, J. D., 2001. Differential ability of transition metals to induce pulmonary inflammation, Toxicol. Appl. Pharmacol. 177, 46-53.

- Riley, M. R., Boesewetter, D. E., Kim, A. M., Sirvent, F. P., 2003. Effects of metals Cu, Fe, Ni, V, and Zn on rat lung epithelial cells, *Toxicology*. 190, 171-184.
- Roberts, E. S., Richards, J. H., Jaskot, R., Dreher, K. L., 2003a. Oxidative stress mediates air pollution particle-induced acute lung injury and molecular pathology, *Inhal. Toxicol.* 15, 1327-1346.
- Roberts, J. R., Michael, D. T., Vincent, C., Robert, W. C., James, M. A., 2003b. Soluble Metals Associated with Residual Oil Fly Ash Increase Morbidity and Lung Injury after Bacterial Infection in Rats, *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*. 67, 251-263.
- Roux, P. P. Blenis, J., 2004. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions, *Microbiol Mol. Biol. Rev.* 68, 320-344.
- Salh, B. S., Martens, J., Hundal, R. S., Yoganathan, N., Charest, D., Mui, A., Gomez-Munoz, A., 2000. PD98059 attenuates hydrogen peroxide-induced cell death through inhibition of Jun N-Terminal Kinase in HT29 cells, *Mol. Cell. Biol. Res. Commun.* 4, 158-165.
- Samet, J. M., Graves, L. M., Quay, J., Dailey, L. A., Devlin, R. B., Ghio, A. J., Wu, W., Bromberg, P. A., Reed, W., 1998. Activation of MAPKs in human bronchial epithelial cells exposed to metals, *Am J Physiol.* 275, L551-L558.
- Samet, J. M., Silbajoris, R., Wu, W., Graves, L. M., 1999. Tyrosine phosphatases as targets in metal-induced signaling in human airway epithelial cells, *Am J Respir. Cell. Mol. Biol.* 21, 357-364.
- Sato, K., Nagao, T., Iwasaki, T., Nishihira, Y., Fukami, Y., 2003. Src-dependent phosphorylation of the EGF receptor Tyr-845 mediates Stat-p21waf1 pathway in A431 cells, *Genes. Cells.* 8, 995-1003.
- Schramek, H., 2002. MAP kinases: from intracellular signals to physiology and disease, *News. Physiol. Sci.* 17, 62-67.
- Silbajoris, R., Ghio, A. J., Samet, J. M., Jaskot, R., Dreher, K. L., Brighton, L. E., 2000. In vivo and in vitro correlation of pulmonary MAP kinase activation following metallic exposure, *Inhal. Toxicol.* 12, 453-468.
- Sjogren, B., Fossum, T., Lindh, T., Weiner, J., 2002. Welding and ischemic heart disease, *Int. J Occup. Environ. Health.* 8, 309-311.
- Soukup, J. M., Ghio, A. J., Becker, S., 2000. Soluble components of Utah Valley particulate pollution alter alveolar macrophage function in vivo and in vitro, *Inhal. Toxicol.* 12, 401-414.
- Stearns, R. C., Paulauskis, J. D., Godleski, J. J., 2001. Endocytosis of ultrafine particles by A549 cells, *Am J Respir. Cell. Mol. Biol.* 24, 108-115.

Su, W. B., Chang, Y. H., Lin, W. W., Hsieh, S. L., 2006. Differential regulation of interleukin-8 gene transcription by death receptor 3 (DR3) and type I TNF receptor (TNFRI), *Exp. Cell. Res.* 312, 266-277.

Swain, W. A., O'Byrne, K. J., Faux, S. P., 2004. Activation of p38 MAP kinase by asbestos in rat mesothelial cells is mediated by oxidative stress, *Am J Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 286, L859-L865.

Tamaoki, J., Isono, K., Takeyama, K., Tagaya, E., Nakata, J., Nagai, A., 2004. Ultrafine carbon black particles stimulate proliferation of human airway epithelium via EGF receptor-mediated signaling pathway, *Am J Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 287, L1127-L1133.

Tao, F., Gonzalez-Flecha, B., Kobzik, L., 2003. Reactive oxygen species in pulmonary inflammation by ambient particulates, *Free. Radic. Biol. Med.* 35, 327-340.

Taylor, M. D., Roberts, J. R., Leonard, S. S., Shi, X., Antonini, J. M., 2003. Effects of welding fumes of differing composition and solubility on free radical production and acute lung injury and inflammation in rats, *Toxicol Sci.* 75, 181-191.

U.S.Department of Labor ©© Occupational Safety & Health Administration, <http://www.osha.gov/doc/outreachtraining/htmlfiles/weldhlth.html>. Welding Health Hazards. 16-2-2006.

Ref Type: Generic

Vallyathan, V. Shi, X., 1997. The role of oxygen free radicals in occupational and environmental lung diseases, *Environ. Health Perspect.* 105 Suppl 1, 165-177.

van Drogen, F. Peter, M., 2002. MAP kinase cascades: scaffolding signal specificity, *Curr Biol.* 12, R53-R55.

Vandenplas, O., Dargent, F., Auverdin, J. J., Boulanger, J., Bossiroy, J. M., Roosels, D., Vande, W. R., 1995. Occupational asthma due to gas metal arc welding on mild steel, *Thorax.* 50, 587-588.

Volonte, D., Galbiati, F., Pestell, R. G., Lisanti, M. P., 2001. Cellular stress induces the tyrosine phosphorylation of caveolin-1 (Tyr(14)) via activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Src kinase. Evidence for caveolae, the actin cytoskeleton, and focal adhesions as mechanical sensors of osmotic stress, *J Biol. Chem.* 276, 8094-8103.

W.M.Blom. Cell death in rat hepatocytes. Apoptosis-inducing and -protective mechanisms. *Eurotox Newsletter* 23-1. 3-2-2003.

Ref Type: Generic

Watanabe, N., Dickinson, D. A., Krzywanski, D. M., Iles, K. E., Zhang, H., Venglarik, C. J., Forman, H. J., 2002. A549 subclones demonstrate heterogeneity in toxicological sensitivity and antioxidant profile, *Am J Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 283, L726-L736.

- Westermarck, J., Li, S. P., Kallunki, T., Han, J., Kahari, V. M., 2001. p38 mitogen-activated protein kinase-dependent activation of protein phosphatases 1 and 2A inhibits MEK1 and MEK2 activity and collagenase 1 (MMP-1) gene expression, *Mol. Cell. Biol.* 21, 2373-2383.
- White, L. R., Marthinsen, A. B., Jakobsen, K., Eik-Nes, K. B., 1983. Response of bovine alveolar macrophages in vitro to welding fume particles, *Environ. Health Perspect.* 51, 211-215.
- Wilson, M. R., Lightbody, J. H., Donaldson, K., Sales, J., Stone, V., 2002. Interactions between Ultrafine Particles and Transition Metals in Vivo and in Vitro, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 184, 172-179.
- Wu, W., Graves, L. M., Gill, G. N., Parsons, S. J., Samet, J. M., 2002a. Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on tyrosine 845 is required for zinc-induced Ras activation, *J Biol. Chem.* 277, 24252-24257.
- Wu, W., Graves, L. M., Jaspers, I., Devlin, R. B., Reed, W., Samet, J. M., 1999. Activation of the EGF receptor signaling pathway in human airway epithelial cells exposed to metals, *Am J Physiol.* 277, L924-L931.
- Wu, W., Jaspers, I., Zhang, W., Graves, L. M., Samet, J. M., 2002b. Role of Ras in metal-induced EGF receptor signaling and NF-kappaB activation in human airway epithelial cells, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 282, L1040-L1048.
- Wu, W., Samet, J. M., Ghio, A. J., Devlin, R. B., 2001. Activation of the EGF receptor signaling pathway in airway epithelial cells exposed to Utah Valley PM, *Am J Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 281, L483-L489.
- Yamagata, T. Ichinose, M., 2006. Agents against cytokine synthesis or receptors, *Eur. J Pharmacol.*
- Yang, J. H., Lee, C. H., Monteiro-Riviere, N. A., Riviere, J. E., Tsang, C. L., Chou, C. C., 2006. Toxicity of jet fuel aliphatic and aromatic hydrocarbon mixtures on human epidermal Keratinocytes: evaluation based on in vitro cytotoxicity and interleukin-8 release, *Arch Toxicol.*
- Yu, I. J., Kim, K. J., Chang, H. K., Song, K. S., Han, K. T., Han, J. H., Maeng, S. H., Chung, Y. H., Park, S. H., Chung, K. H., Han, J. S., Chung, H. K., 2000. Pattern of deposition of stainless steel welding fume particles inhaled into the respiratory systems of Sprague-Dawley rats exposed to a novel welding fume generating system, *Toxicol. Lett.* 116, 103-111.
- Zhang, Q., Adiseshaiah, P., Reddy, S. P., 2005. Matrix metalloproteinase/epidermal growth factor receptor/mitogen-activated protein kinase signaling regulate fra-1 induction by cigarette smoke in lung epithelial cells, *Am J Respir. Cell. Mol. Biol.* 32, 72-81.